

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

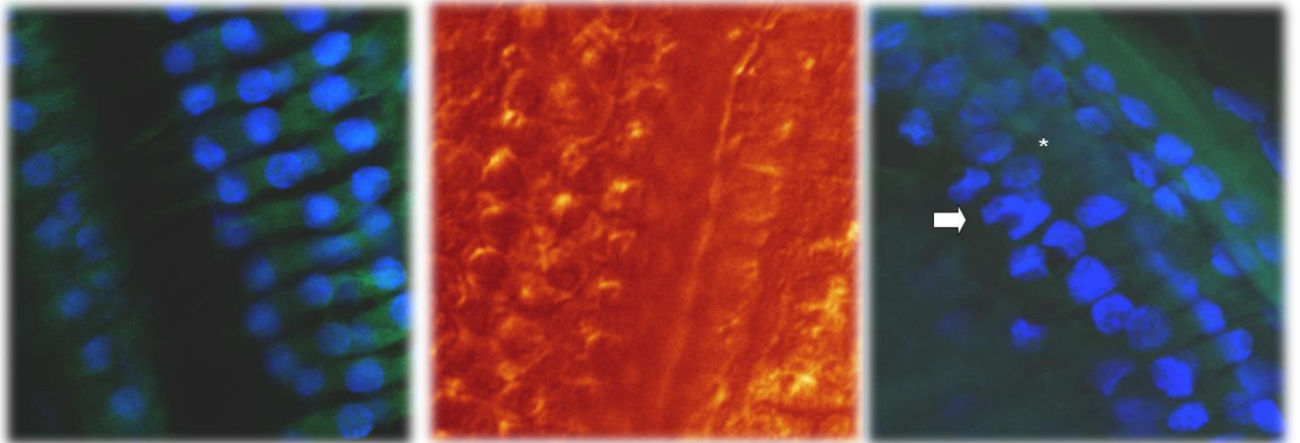
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

(OTORRINOLARINGOLOGÍA)



**EFICACIA DE LA LUTEINA EN LA PREVENCIÓN DE LA
OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO. ESTUDIO *IN VITRO* E *IN*
VIVO.**



TESIS DOCTORAL

AMAYA ROLDÁN FIDALGO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

(OTORRINOLARINGOLOGÍA)



**EFICACIA DE LA LUTEINA EN LA PREVENCIÓN DE LA
OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO. ESTUDIO *IN VITRO* E *IN
VIVO*.**

DIRECTOR DE TESIS DOCTORAL

DRA. MARÍA ALMUDENA TRINIDAD CABEZAS

Profesora Asociada de la Universidad Autónoma de Madrid.

Médico Adjunto del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario

Puerta de Hierro Majadahonda.

MADRID, 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Trinidad y al Dr. Ramírez-Camacho el haberme iniciado en el mundo de la investigación otológica; gracias a ellos hoy es posible la lectura de la presente tesis doctoral.

A Begoña Olmedilla y el departamento del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentación y Nutrición (ICTAN) por su ayuda en el procesamiento y cuantificación de luteína en las muestras de perilinfa coclear.

A Sergio Martín Saldaña, por su colaboración en la realización del estudio de luteína en la línea celular HEI-OC1, sin la cual dicho trabajo no habría sido posible.

A Isabel Millán del Departamento de Estadística del Hospital Universitario Puerta de Hierro por su colaboración en el análisis estadístico de los datos y a María José Coronado de la Unidad de Microscopía Confocal del Hospital Universitario Puerta de Hierro por su participación en el procesamiento y análisis de las muestras histológicas.

A la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, por permitir la utilización de sus instalaciones para la realización de la parte experimental del trabajo y a los técnicos, auxiliares y veterinarios de este Servicio, por su cooperación en todo momento.

Y por último a mis padres, hermana y abuelos, por todo el cariño y apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera profesional.

DEDICATORIA

A mi familia y en especial a mi madre, por su ayuda y apoyo constante.

ÍNDICE

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | EL DESAFÍO DE LA OTOTOXICIDAD | 3 |
| 1.1.1 | CONCEPTO DE OTOTOXICIDAD..... | 3 |
| 1.1.2 | CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA | 3 |
| 1.1.3 | AGENTES CAUSANTES..... | 5 |
| 1.1.4 | CISPLATINO..... | 7 |
| 1.1.4.1 | ESTRUCTURA Y APLICACIONES..... | 7 |
| 1.1.4.2 | MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN | 8 |
| 1.1.4.3 | TOXICIDAD ORGÁNICA..... | 9 |
| 1.1.4.4 | OTOTOXIDAD | 10 |
| 1.1.4.4.1 | MANIFESTACIONES CLÍNICAS..... | 12 |
| 1.1.4.4.2 | DIAGNÓSTICO Y CUANTIFICACIÓN DE LA OTOTOXICIDAD | 13 |
| 1.1.4.4.3 | FISIOPATOLOGÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO..... | 17 |
| 1.2 | OTOPROTECCIÓN..... | 24 |
| 1.2.1 | CONCEPTO..... | 24 |
| 1.2.2 | ESTRATEGIAS ACTUALES..... | 24 |
| 1.2.3 | AGENTES EMPLEADOS..... | 24 |
| 1.2.3.1 | AGENTES QUÍMICOS | 24 |
| 1.2.3.2 | AGENTES FÍSICOS | 25 |
| 1.2.3.3 | VÍAS DE ADMINISTRACIÓN | 26 |
| 1.2.4 | MODELOS PRECLÍNICOS EN OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO | 27 |
| 1.2.4.1 | CULTIVOS CELULARES | 27 |
| 1.2.4.2 | MODELOS ANIMALES..... | 28 |
| 1.2.5 | EVIDENCIAS CLÍNICAS DE OTOPROTECCIÓN FRENTE A CISPLATINO | 29 |
| 1.2.6 | VÍA DE ADMINISTRACIÓN..... | 31 |
| 1.2.6.1 | BASES ANATÓMICAS PARA LA ADMINISTRACIÓN INTRATIMPÁNICA..... | 31 |
| 1.2.6.2 | FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PASO DE SUSTANCIAS AL OÍDO INTERNO | 34 |
| 1.2.6.2.1 | FACILITADORES DE DIFUSIÓN | 35 |
| 1.3 | LUTEÍNA..... | 36 |
| 1.3.1 | CARACTERÍSTICAS MOLECULARES..... | 36 |
| 1.3.2 | APLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES | 36 |
| 1.3.2.1 | ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA CARDIACA..... | 36 |
| 1.3.2.2 | ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA CUTÁNEA..... | 37 |
| 1.3.2.3 | ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA OCULAR..... | 37 |
| 2. | OBJETIVOS | 41 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 45 |
| 3.1 | CULTIVOS CELULARES..... | 47 |
| 3.1.1 | LÍNEA CELULAR HEI-OC1..... | 47 |
| 3.1.2 | ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR..... | 48 |
| 3.1.3 | TINCIÓN DE HOECHST | 48 |
| 3.1.4 | ENSAYO DE TOXICIDAD DE LUTEÍNA | 49 |
| 3.1.5 | ENSAYO DE TOXICIDAD DE CISPLATINO | 49 |
| 3.1.6 | EFFECTOS DE LA LUTEÍNA FRENTE A CISPLATINO | 49 |
| 3.1.7 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 49 |
| 3.2 | ESTUDIO <i>IN VIVO</i> | 49 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.1 | ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN | 50 |
| 3.2.2 | DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 51 |
| 3.2.2.1 | GRUPOS DE ESTUDIO | 51 |
| 3.2.2.2 | FÁRMACOS UTILIZADOS..... | 52 |
| 3.2.3 | PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES..... | 53 |
| 3.2.3.1 | ANESTESIA..... | 53 |
| 3.2.3.2 | ESTUDIO FUNCIONAL | 53 |
| 3.2.3.3 | TÉCNICA DE INYECCIÓN INTRATIMPÁNICA | 55 |
| 3.2.3.4 | TÉCNICA DE ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE CISPLATINO | 56 |
| 3.2.3.5 | CONTROL POSTOPERATORIO INMEDIATO | 57 |
| 3.2.3.6 | EUTANASIA..... | 57 |
| 3.2.4 | PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS | 57 |
| 3.2.4.1 | EXTRACCIÓN Y FIJACIÓN COCLEAR | 57 |
| 3.2.4.2 | MARCADO INMUNOHISTOQUÍMICO | 58 |
| 3.2.4.3 | PREPARACIONES DE SUPERFICIE | 58 |
| 3.2.5 | CUANTIFICACIÓN DE LA LUTEÍNA | 59 |
| 3.2.6 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 60 |
| 3.3 | REVISIÓN DE LA LITERATURA..... | 61 |
| 3.3.1 | ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA..... | 61 |
| 3.3.2 | CRITERIOS DE SELECCIÓN..... | 62 |
| 4. | RESULTADOS | 63 |
| 4.1 | CULTIVOS CELULARES | 65 |
| 4.2 | ESTUDIO IN VIVO | 67 |
| 4.2.1 | GRUPOS CONTROL CON ADMINISTRACIÓN DE DMSO (I y II) | 67 |
| 4.2.1.1 | RESULTADOS FUNCIONALES | 67 |
| 4.2.1.2 | RESULTADOS HISTOLÓGICOS | 71 |
| 4.2.2 | GRUPOS CONTROL Y DE ESTUDIO CON ADMINISTRACIÓN DE LUTEINA | 73 |
| 4.2.2.1 | RESULTADOS FUNCIONALES | 73 |
| 4.2.2.2 | RESULTADOS HISTOLÓGICOS | 77 |
| 4.2.2.3 | DIFUSIÓN DE LA LUTEÍNA AL OÍDO INTERNO | 81 |
| 4.3 | SUSTANCIAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS ANIMALES FRENTE A LA OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO | 81 |
| 4.3.1 | MODELO ANIMAL | 82 |
| 4.3.2 | SUSTANCIAS PROTECTORAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN..... | 88 |
| 4.3.3 | DOSIS DE CISPLATINO Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN | 88 |
| 4.3.4 | TIEMPO DE EVALUACIÓN TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE CISPLATINO | 89 |
| 4.3.5 | MEDICIÓN DE LOS RESULTADOS FUNCIONALES..... | 89 |
| 4.3.6 | RESULTADOS FUNCIONALES E HISTOLÓGICOS..... | 89 |
| 5. | DISCUSIÓN | 91 |
| 5.1 | EFFECTOS DE LA LUTEÍNA <i>IN VITRO</i> | 93 |
| 5.2 | IDONEIDAD DEL DMSO COMO VEHÍCULO EN ESTUDIOS DE OTOPROTECCIÓN..... | 93 |
| 5.3 | EFFECTOS DE LA LUTEÍNA IN VIVO | 95 |
| 5.4 | MODELOS MAMÍFEROS DE OTOPROTECCIÓN FRENTE A CISPLATINO | 97 |
| 5.5 | CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN CANDIDATO A OTOPROTECTOR | 102 |

| | | |
|----|--------------------|-----|
| 6. | CONCLUSIONES | 103 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 107 |
| 8. | ANEXOS | 135 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| AAV | Virus Adeno-Asociado |
| AIF | Factor Inductor de la Apoptosis Celular |
| ANOVA | Análisis de la Varianza |
| BDNF | Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro |
| BSA | Suero de albúmina bovina |
| CAP | Potencial de Acción Compuesto |
| CAPE | Derivado Fenetil Éster del Acido Cafeico |
| CCE | Células ciliadas externas |
| CCI | Células ciliadas internas |
| CCPA | 2-cloro-N-ciclopentiladenosina (agonista específico de receptor A1 de adenosina) |
| CdC2 | Proteína quinasa dependiente de Ciclina |
| CGS | 2-(4-(2-p-carboxi-etil) fenil amino)-5'-N-etil carboxamida adenosina (agonista específico de receptor A2A de adenosina) |
| c-Myb | Factor de transcripción de la familia Myb |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| COG | Grupo de Oncología infantil (<i>Children's Oncology Group</i>) |
| CREB | Proteína reguladora de la unión de AMP-cíclico y calcio |
| CSIC | Consejo Superior de Investigaciones Científicas |
| dB | Decibelios |
| DDTC | Dietilditiocarbamato de sodio |
| DMEM | Modificación de Medio Basal Eagle |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DP | Productos de Distorsión |
| DPCPX | 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (antagonista específico de receptor A1 de adenosina) |

| | |
|-------------------------------|--|
| E2F | Factor de transcripción de ciclo celular |
| ECoG | Electrococleografía |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ERK | Quinasa reguladora de la señal extracelular |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| EtOH | Etanol |
| FBS | Suero bovino fetal |
| FKHRL | Factor de transcripción <i>Forkhead</i> |
| GGA | Genaril-genaril acetona |
| GST | Glutation-S-Transferasa |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HEI-OC1 | Línea celular Órgano de Corti 1-Instituto Otológico House (<i>House Ear Insitute - Organ of Corti 1</i>) |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| HSP | Proteínas de choque térmico |
| HSP32 | Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) |
| HSP70 | Proteína de choque térmico de 70kDa |
| ICTAN | Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentación y Nutrición |
| IL1b | Interleucina 1b |
| IL18 | Interleucina 18 |
| im | Intramuscular |
| JNK | c-Jun N-terminal Quinasa |
| K ⁺ | Potasio |
| kDa | Kilodalton |
| kHz | KiloHercios |
| KIM-1 | Molécula de lesión renal-1 |
| MAPK | MAP Quinasa |
| MKK | MAP Quinasa Quinasa |

| | |
|-------------|--|
| MCLB | Microscopio confocal láser de barrido |
| MTBA | Ácido 4-metiltiobenzoico |
| N7 | Nitrógeno 7 |
| NAC | N-acetilcisteína |
| NADPH-NOX3 | Oxidasa (homólogo 3) de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfatasa |
| NER | Reparación por Escisión de Nucleótidos |
| NFK β | Factor nuclear Kappa- β |
| PARP1 | Polimerasa Poli ADP-Ribosa 1 |
| PEAee | Potenciales Evocados Auditivos de estado estable |
| PEATC | Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral |
| PRE | Pre-tratamiento |
| POST | Post-tratamiento |
| RPE | Célula epitelial de pigmento retiniano |
| R-PIA | R-fenil-isopropil-adenosina (agonista selectivo de receptor A1 de adenosina) |
| S-2 WR-2721 | ácido S2 (3-aminopropilamino) etilfosforotioico (amifostina) |
| SIOPEL | Grupo de estudio de las neoplasias primarias de hígado de la infancia |
| SSF | Suero salino fisiológico |
| STS | Tiosulfato de sodio |
| ssADN | ADN monocatenario |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitorio vaniloide-1 |
| UVB | Radiación ultravioleta B |
| XIAP | Inhibitor de apoptosis ligado a X |

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El presente estudio se incardina en una de las líneas de investigación en oído interno desarrollada en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, dentro del ámbito de la otoprotección.

1.1 EL DESAFÍO DE LA OTOTOXICIDAD

Entre las principales causas de la hipoacusia en seres humanos se encuentra la degeneración relacionada con la edad (presbiacusia), la exposición al ruido, las secuelas infecciosas y la ototoxicidad, entre otras. En cuanto a esta última, es bien conocido que existen moléculas orgánicas e inorgánicas que pueden lesionar el órgano sensorial del oído interno produciendo pérdida de audición y alteración del equilibrio, en algunos casos de forma permanente. El principal reto de la investigación sobre otoprotección se centra en encontrar un fármaco que antagonice el efecto de estos ototóxicos a nivel local, sin alterar su acción a nivel sistémico.

Son muchas las líneas de investigación, tanto clínicas como preclínicas, que estudian la vía de apoptosis celular desencadenada por los agentes ototóxicos, con el fin de frenar esta cascada y así proteger el oído interno. Sin embargo, no existe actualmente ningún fármaco que haya demostrado su utilidad para prevenir la ototoxicidad en humanos.

1.1.1 CONCEPTO DE OTOTOXICIDAD

La ototoxicidad se define como el efecto nocivo que determinados fármacos o diversas sustancias químicas no farmacológicas ejercen sobre el oído interno produciendo alteraciones transitorias o definitivas de la función auditiva, vestibular o de ambas (Gil Carcedo y cols., 2007). Se consideran medicamentos ototóxicos aquellos con capacidad de dañar las estructuras del oído interno (particularmente la cóclea y las células vestibulares) y el nervio auditivo.

1.1.2 CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA

La ototoxicidad se puede manifestar como hipoacusia, acúfenos y vértigo o inestabilidad. Según la función que se lesione se puede hablar de toxicidad coclear (si el paciente presenta síntomas auditivos como hipoacusia o acúfenos) o vestibular (si principalmente presenta alteración del equilibrio). La toxicidad coclear puede abarcar desde un pequeño empeoramiento en el umbral auditivo, sólo detectable a través de audiometrías convencionales o de ultra-altas frecuencias (afectación subclínica), hasta una pérdida completa de audición.

La primera manifestación clínica suele ser la presencia de acúfenos, en general bilaterales, de inicio brusco y gran intensidad, pudiendo estar o no acompañados de pérdida de audición. La pérdida auditiva inicial, por lo general, se limita a las frecuencias agudas del espectro auditivo ($>4000\text{Hz}$), pudiendo afectar posteriormente a las frecuencias graves si la administración del fármaco ototóxico continúa. En algunos pacientes la pérdida de audición afecta a todas las frecuencias por igual desde el inicio del tratamiento. De forma paralela al daño coclear, se puede desarrollar una toxicidad vestibular, desencadenando la aparición de vértigo, inestabilidad, mareos inespecíficos y nistagmo. Estos síntomas pueden ser enmascarados por los mecanismos de compensación central, debido al desarrollo lento y progresivo de los mismos.

Hasta la fecha la incidencia exacta de la ototoxicidad no ha sido bien establecida (Anniko, 2013). Existen diversos factores que influyen en su aparición:

- ✓ **Alteración de la función renal.** El fallo renal supone una disminución en la eliminación del fármaco por esta vía y por consiguiente un mayor riesgo de ototoxicidad al aumentar la concentración del mismo a nivel sistémico.
- ✓ **Existencia previa de hipoacusia.** El nivel de audición pretratamiento se ha identificado como un factor predictivo independiente para la pérdida auditiva tras la administración del fármaco ototóxico (Zuur y cols., 2007).
- ✓ **Exposición a radiaciones.** Especialmente con el tratamiento radioterápico sobre la región del hueso temporal (incluyendo las estructuras del oído interno).
- ✓ **Existencia de una susceptibilidad genética.** Se están identificando, cada vez en mayor número, regiones del ADN relacionadas con una mayor susceptibilidad auditiva a los fármacos ototóxicos (Graterol Torres y cols., 2011).
- ✓ **Exposición previa a ruido.** Especialmente si se trata de una exposición crónica al mismo.
- ✓ **Presencia de infecciones óticas.** Esencialmente si son de repetición.
- ✓ **Dosis diaria empleada del agente ototóxico.** A mayor dosis, mayor riesgo de toxicidad, no solo de la dosis individual, sino también de la dosis acumulada final, como en el caso del tratamiento con cisplatino (Bokemeyer y cols., 1998).
- ✓ **Tiempo total de administración del agente ototóxico.** A mayor tiempo de administración, mayor riesgo de ototoxicidad.
- ✓ **Administración concomitante de otros agentes potencialmente ototóxicos.** Principalmente con el uso de aminoglucósidos y diuréticos (furosemida).

- ✓ **Estado nutricional.** Los pacientes con hipoalbuminemia y anemia desarrollan una hipoacusia más severa que aquellos con parámetros normales de albúmina y hemoglobina (Blakley y cols., 1994).
- ✓ **Edad del paciente.** Los menores de 5 años y las personas de edad avanzada son más susceptibles a sufrir hipoacusia que los adultos jóvenes (Laurell y Jungneltus, 1990; Li y cols., 2004). Los prematuros suelen precisar de estancias en la unidad de cuidados intensivo (UCI), donde es frecuente el empleo de fármacos ototóxicos.

1.1.3 AGENTES CAUSANTES

El neuroepitelio de la cóclea puede lesionarse tanto por sustancias endógenas (generadas en la diabetes, síndrome urémico e hiperbilirrubinemia) como por sustancias externas (principalmente medicamentos). Son numerosos los medicamentos asociados a la aparición de ototoxicidad, existiendo en el mercado más de 130 fármacos ototóxicos. En algunos casos como el de los fármacos aminoglucósidos, la aparición de una posible lesión auditiva es ampliamente conocida desde su introducción en la Medicina. Sin embargo, no lo es tanto con otras sustancias muy utilizadas en la práctica clínica habitual, como son la aspirina y el naproxeno.

En la tabla 1 se muestran los principales fármacos asociados a toxicidad auditiva y/o vestibular. Las sustancias más estudiadas en ototoxicidad son los aminoglucósidos, los diuréticos del asa y los fármacos antineoplásicos.

Los **aminoglucósidos** son un grupo de medicamentos muy ototóxicos que también producen toxicidad a nivel renal. La hipoacusia producida por los mismos es dependiente de la dosis, y en ocasiones puede llegar a ser irreversible. Dentro de este grupo de medicamentos existen fármacos que lesionan principalmente la cóclea (como la dihidroestreptomicina y la kanamicina) y otros que ejercen su acción nociva principalmente sobre el sistema vestibular (sulfato de estreptomicina y gentamicina). Existe un componente genético que determina una mayor susceptibilidad al efecto ototóxico de dosis bajas de estos antibióticos (Fischel-Ghodsian, 1999). La mutación A1555G en el gen del rRNA 12S del genoma mitocondrial es la responsable de la aparición de hipoacusia no sindrómica y de un incremento en la susceptibilidad a la acción ototóxica de los aminoglucósidos. Esta mutación se ha encontrado en el 15-20% de los casos familiares de hipoacusia no sindrómica en la población española, independientemente del patrón de herencia y de la edad de inicio (Sarduy y cols., 1998; Kupka y cols., 2002).

Dentro del grupo de los **fármacos antineoplásicos** es el cisplatino el que presenta mayor riesgo de desarrollar ototoxicidad. Otros derivados del platino también presentan un potencial efecto ototóxico (como el carboplatino) y los derivados de los alcaloides de la vinca como la vincristina.

| MEDICAMENTOS OTOTÓXICOS | | |
|--|--|---|
| <i>DIURÉTICOS</i> Bumetanida Furosemida Piretanida Torasemida Ácido etacrínico Acetazolamida <i>AINES</i> Ácido acetilsalicílico Ácido mefenámico Indometacina Naproxeno Piroxicam <i>ANTIPALÚDICOS</i> Cloroquina Quinina Pirimetamina <i>ANALGÉSICOS</i> Hidromorfona <i>ANESTÉSICOS</i> Óxido nítrico <i>ANTIEPILEPTICOS</i> Ácido Valproico Carbamazepina Gabapentina <i>ANTIPSICÓTICOS</i> Clorpromazina | <i>AMINOGLUCOSIDOS</i> Estreptomina Dihidroestreptomina Neomicina Gentamicina Kanamicina Tobramicina Amikacina Sisomicina Minociclina Netilmicina <i>ANFENICOLES</i> Cloranfenicol <i>MACRÓLIDOS</i> Azitromicina Claritromicina Eritromicina <i>TETRACICLINAS</i> Minociclina <i>ANTITUBERCULOSOS</i> Capreomicina <i>ANTIMICÓTICOS</i> Anfotericina B <i>ANTIVIRALES</i> Didanosina Ribavirina Zidovudina | <i>ANTINEOPLASICOS</i> Bleomicina Mostaza nitrogenada Cisplatino Carboplatino Oxaliplatino Vinblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina Daunorubicina Fludarabina Metotrexato Ciclofosfamida Fotemustina Ifosfamida Paclitaxel Etopósido Bortezomib <i>OTROS</i> Deferoxamina Metadona Sildenafil Vancomicina Metronidazol Interferón |

Tabla 1. Principales fármacos asociados a toxicidad coclear y/o vestibular.

Tanto los aminoglucósidos como los derivados del platino lesionan principalmente las células cocleares. Este daño se inicia en la espira basal de la cóclea, produciendo una pérdida auditiva en frecuencias agudas.

Los **diuréticos del asa**, y en especial la furosemida, también ejercen una acción tóxica sobre el oído interno, produciendo una hipoacusia generalmente reversible. Su principal efecto estriba en la inhibición de la ATP-asa de sodio-potasio de la estría vascular coclear, alterando el equilibrio iónico endolinfático. Al afectar a la estría vascular producen una pérdida auditiva pantonal. Es importante conocer que el uso conjunto de estos medicamentos con los fármacos aminoglucósidos potencia la acción ototóxica de estos últimos, desarrollándose una pérdida de audición más acentuada que la generada por ambos fármacos de forma individual.

1.1.4 CISPLATINO

El cisplatino es un agente antitumoral empleado frecuentemente en el tratamiento de diversos tumores sólidos.

Es bien conocido que produce ototoxicidad entre sus efectos secundarios. Esta circunstancia lo ha convertido en uno de los medicamentos más empleados a la hora de desarrollar un modelo experimental de ototoxicidad.

1.1.4.1 ESTRUCTURA Y APLICACIONES

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino(II) ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{Cl}_2)(\text{NH}_3)_2]$) (Fig. 1) es un quimioterápico que se emplea en régimen de monoterapia y como parte de una quimioterapia múltiple, con intención curativa y paliativa, incluidos tumores avanzados y metastásicos: carcinoma testicular (poliquimioterapia curativa y paliativa), carcinoma de ovario (estadios III y IV), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (terapia curativa en combinación con radioterapia, y quimioterapia paliativa), cáncer avanzado de vejiga y carcinoma de pulmón (microcítico y no microcítico avanzado).

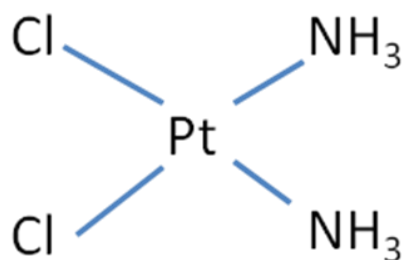


Figura 1. Estructura molecular del cisplatino

Las principales contraindicaciones de la administración de cisplatino son la hipersensibilidad a fármacos con platino, disfunción renal, deshidratación, mielosupresión, deterioro auditivo, neuropatía, embarazo y lactancia, combinación con la vacuna de la fiebre amarilla y con fenitoína como uso profiláctico.

1.1.4.2 MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN

El cisplatino posee dos moléculas de cloro dentro de su estructura química (Fig. 1). En la sangre, la concentración de cloruro es relativamente alta, por lo que el cisplatino se mantiene en su estructura química original. Su paso al interior de la célula se realiza mediante transportadores de cobre Ctrl y OCT2 (catión transportador orgánico)(Ciarimboli y cols., 2010) y por difusión pasiva (Wang y cols., 2005). En cuanto el cisplatino entra en la célula se hidrata, y en su forma hidratada es más reactivo. La hidratación del cisplatino se produce debido al intercambio en el interior de la célula de uno o dos de sus átomos de cloro por moléculas de agua. La baja concentración de cloro en el interior celular favorece dicho intercambio. La molécula resultante de la hidratación está cargada positivamente y permite que el átomo de platino forme enlaces covalentes con los nucleótidos de las bases de guanina y adenina del ADN celular (Rybak LP, 2007) y en especial con el nitrógeno 7 (N7) de la guanina (Rozenewerg y cols., 1977). Esta unión forma entrecruzamientos inter- e intra-catenarios en la doble cadena de ADN. Algunos de ellos pueden ser subsanados por el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER), pero otros no. Los enlaces entre el ADN y el cisplatino bloquean la replicación del ADN parando el ciclo celular e inhibiendo la transcripción y posterior trasducción de proteínas.

Ante la agresión celular por el cisplatino y otras noxas externas, se producen en la célula mecanismos pro- y anti-apoptóticos (Fig. 2). El resultado del desequilibrio hacia los mecanismos pro-apoptóticos termina con la muerte celular por apoptosis. Si el estímulo estresante es muy severo, los mecanismos de apoptosis se ven sobrepasados y la célula muere por necrosis.

Las principales moléculas anti-apoptóticas son la familia de las quinasas (MAPK -MAP quinasa- o ERK -quinasa reguladora de señal extracelular-) y la familia Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-X).

Moléculas de estas mismas familias también intervienen en el mecanismo pro-apoptótico; las quinasas JNK (c-Jun N-terminal quinasa), MKK (MAP quinasa quinasa) y CdC2 (proteína quinasa dependiente de ciclina) y de la familia Bcl-2 Bax, Bak, Bad, etc. Existe una regulación entre las familias de la Bcl-2 y las quinasas mediante procesos de fosforilación y desfosforilación.

Además de las anteriores, existen otras moléculas implicadas en la decisión celular de muerte programada o apoptosis, como son la p53, E2F, FKHRL (factor de transcripción *forkhead*) y c-Myb (activador transcripcional de la familia Myb).

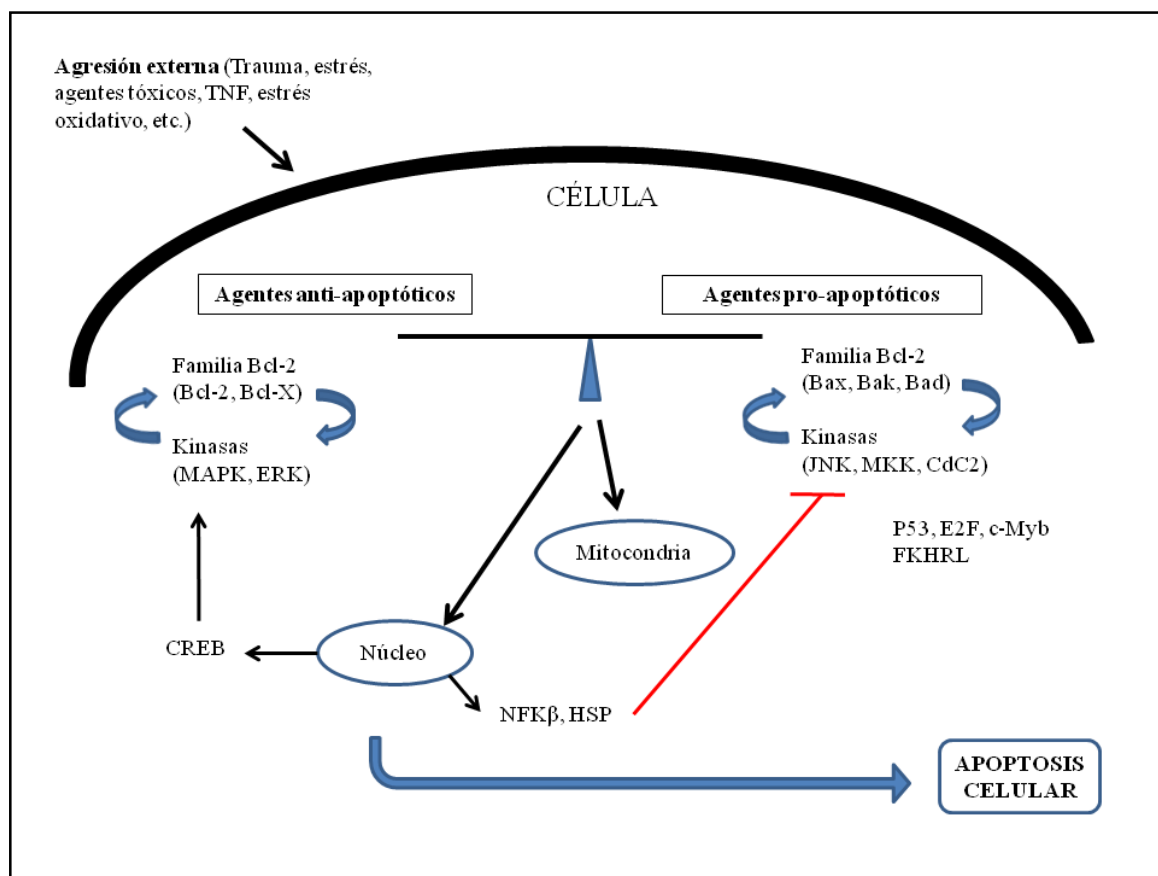


Figura 2. Esquema de los mecanismos implicados en la apoptosis celular tras un estímulo externo. Se representan las dos principales familias de moléculas implicadas: quinasas (MAPK, ERK, JNK, MKK, Cdc2) y la familia bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bad).

Las moléculas HSP (proteínas de choque térmico) y el NFκβ (factor nuclear kappa-β) ejercen una regulación negativa sobre la JNK, inhibiendo así la apoptosis celular, mientras que la CREB (proteína reguladora de la unión entre Ca⁺⁺ y AMP cíclico) estimula la acción de la vía anti-apoptótica de forma directa.

1.1.4.3 TOXICIDAD ORGÁNICA

Los fenómenos de destrucción celular previamente citados pueden alcanzar una magnitud suficiente como para interferir en el funcionamiento de diferentes aparatos y sistemas. Los más frecuentemente afectados son el sistema gastrointestinal, el aparato renal, el sistema nervioso y el oído.

1. **Gastrointestinal.** El principal efecto que ejerce el cisplatino sobre el aparato digestivo es la aparición de náuseas y vómitos. Estos síntomas suelen ser intensos y pueden aparecer durante el tratamiento o bien una vez finalizado el mismo. En ocasiones es necesaria la administración de fármacos antieméticos, incluso antes de comenzar la infusión de cisplatino.

2. **Renal.** El cisplatino a nivel renal causa un fracaso renal agudo al lesionar los túbulos proximales y distales. La intensidad de la lesión guarda relación con la dosis y puede ser irreversible. La toxicidad aparece con dosis de 2 mg/kg ó 50-75 mg/m², y su efecto se puede evitar administrando abundante hidratación al paciente y empleando diuresis osmótica con manitol. Durante el tratamiento se aprecia una disminución del aclaramiento de creatinina, y una marcada pérdida de magnesio que puede originar un cuadro agudo de hipomagnesemia que exige su reposición.

3. **Toxicidad medular.** La acción lesiva del cisplatino sobre la médula ósea produce la aparición de leucopenia, trombocitopenia y anemia dependientes de dosis.

4. **Neurotoxicidad.** Neuropatía periférica bilateral y principalmente sensitiva (aunque también puede existir un componente motor).

5. **Ototoxicidad.** La lesión del oído interno por cisplatino genera la aparición de una hipoacusia neurosensorial bilateral, progresiva y dependiente de dosis, pudiendo afectar también al sistema vestibular, aunque de manera infrecuente, produciendo alteraciones del equilibrio (Prim y cols., 2001).

1.1.4.4 OTOTOXIDAD

La ototoxicidad inducida por cisplatino se observa, según la ficha técnica del fármaco, hasta en un 36% de los pacientes tratados con una dosis única de cisplatino de 50mg/m², pudiendo encontrarse una incidencia más alta en niños y ancianos. Según investigadores independientes, entre un 60 y un 80% de los pacientes tratados con cisplatino desarrollan hipoacusia (Salehi y cols., 2014; Rybak., 2009; Al-Khatib y cols., 2010), siendo mayor dicho porcentaje al incrementarse la dosis acumulada de cisplatino. La aparición de este efecto adverso depende, como hemos visto anteriormente, entre otros factores de la dosis administrada y de la duración del tratamiento.

Existen varios factores que puede predisponer a una susceptibilidad individual frente a la acción del cisplatino en el oído interno:

- ✓ Existencia de una **predisposición genética** frente a la ototoxicidad por cisplatino. Se conoce que ciertas mutaciones en el ADN mitocondrial pueden causar enfermedades o fenotipos clínicos por sí mismos, o bien en presencia de un factor predisponente (Huang y cols., 2007; Graterol Torres y cols., 2011).
- ✓ Presencia de **polimorfismos** (variantes de expresión génica) de las distintas enzimas implicadas en la vía de apoptosis celular inducida por cisplatino, como es el caso de la glutatión-S-transferasa (GST) (Ünal y cols., 2007).
- ✓ Presencia del **alelo-A de RS2075252 de la megalina**, una lipoproteína de baja densidad expresada en las células del túbulo proximal del riñón y en las células marginales del oído interno, que presenta una mayor expresión en los pacientes tratados con cisplatino que desarrollaron alteraciones auditivas (Ünal y cols., 2007).
- ✓ Tratamiento con **radioterapia**. La terapia conjunta parece predisponer a un mayor daño ototóxico. Este hecho se evidenció en el estudio de Hitchcock y cols. del año 2009, en el cual se observó una potenciación del efecto ototóxico del cisplatino en personas tratadas con radioterapia administrada en localizaciones cercanas a la cóclea. Los pacientes con cáncer de cabeza y cuello que recibieron radioterapia exclusiva empleando dosis menores de 40 Gy no sufrieron pérdida de audición clínicamente significativa. Sin embargo, cuando se combinaba la radioterapia con cisplatino en dosis de 100mg/m², se producía una hipoacusia neurosensorial profunda, a partir de una dosis de radioterapia de 10 Gy. Los carcinomas de cabeza y cuello suelen requerir dosis de radioterapia de 65-75 Gy.

A nivel histológico, la aparición de pérdida auditiva se asocia con la lesión de las células ciliares. Aunque en un principio se postuló la teoría de que el daño inicial del cisplatino se producía sobre las células ciliadas externas (Fig. 3), investigaciones recientes han demostrado que la lesión más inicial se produce sobre la estría vascular y/o las células de soporte, alterando el equilibrio electrolítico de las células ciliadas externas e internas y generando la aparición de lesiones estructurales y funcionales en las mismas (Ramírez-Camacho y cols., 2002).

1.1.4.4.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La ototoxicidad asociada a cisplatino se manifiesta con hipoacusia neurosensorial bilateral, progresiva, acumulativa y dependiente de dosis (Rybak y cols., 2007), pudiendo estar acompañada de acúfenos, otalgia y alteración del equilibrio.

La pérdida de audición inicial afecta a las frecuencias más agudas del espectro auditivo humano. Tradicionalmente se ha considerado que la afectación de frecuencias por encima de 6.000 Hz no tenía repercusiones auditivas perceptibles por el paciente. Sin embargo, existe una creciente evidencia de que ciertos componentes lingüísticos se encuentran en el espectro auditivo agudo, como ciertos fonemas que se encuentran situados entre los 4.000 y los 8.000 Hz, incluso en frecuencias más altas, especialmente en las consonantes fricativas (Rodríguez-Valiente y cols., 2009). Las frecuencias superiores a 8.000 Hz, denominadas ultra-altas frecuencias o extensión en altas frecuencias, juegan un papel importante en la localización del sonido (Best y cols., 2005), y en el entendimiento de la palabra, especialmente en ambientes ruidosos (Rodríguez Valiente y cols, 2009). Pese a esto, no son exploradas de forma rutinaria en la clínica. Su estudio es de carácter experimental hoy en día, aunque cada vez más autores y organismos oficiales recomiendan su uso para hacer una detección precoz de la pérdida ocasionada por ototóxicos (Fausti y cols., 1994; Knight y cols., 2007; Ress y cols., 1999; Wright y Schaefer, 1982;. ASHA, 1994)

Con el avance de la toxicidad auditiva, la hipoacusia se va extendiendo hacia frecuencias más graves, llegando a afectar a las frecuencias consersacionales y al entendimiento de la palabra, repercutiendo en la calidad de vida y limitando la actividad social del paciente.

La ototoxicidad puede desarrollarse tanto de forma temprana, como meses o años después de recibido el tratamiento. A pesar de que otros efectos secundarios como la nefrotoxicidad pueden reducirse o controlarse con terapias de rehidratación, la ototoxicidad se presenta como una limitación a la hora de realizar quimioterapia con cisplatino (Paksoy y cols., 2011). Se debe realizar un estrecho seguimiento del paciente mediante audiometrías seriadas antes de iniciar un nuevo ciclo de cisplatino, recomendándose controles auditivos periódicos incluso años después de finalizado el tratamiento, especialmente en la población infantil.

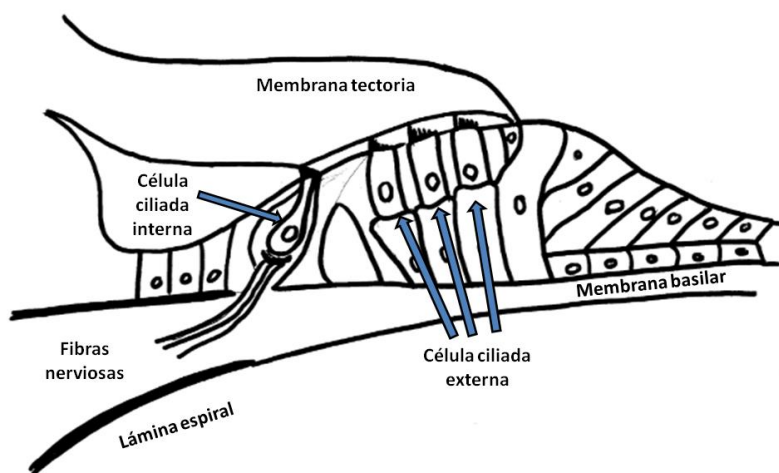


Figura 3. Estructura anatómica del oído interno. Se puede observar la disposición del órgano de Corti sobre la membrana basilar, así como la ubicación de las células ciliadas y de la estría vascular.

Además de la toxicidad coclear se han descrito casos de toxicidad vestibular por cisplatino. Existen pocos artículos que evalúen su efecto nocivo sobre el sistema vestibular, se han descrito casos de aparición de inestabilidad, nistagmo espontáneo y posicional, y alteración de pruebas de exploración otoneurológica como las pruebas calóricas y rotatorias (Prim y cols., 2001; Kobayashi y cols., 1987).

1.1.4.4.2 DIAGNÓSTICO Y CUANTIFICACIÓN DE LA OTOTOXICIDAD

No existen pruebas específicas que determinen si una lesión auditiva ha sido producida por fármacos ototóxicos, por lo que el antecedente de exposición a los mismos es fundamental para el diagnóstico. A la hora de cuantificar la afectación otológica producida tras su administración se dispone en la actualidad de varias herramientas de medida.

Audiometría tonal liminar

La audiometría tonal liminar emplea, como estímulos sonoros, tonos puros de frecuencia e intensidad conocidas. El objetivo es determinar la mínima intensidad a la que el paciente es capaz de oír el estímulo presentado (umbral de audición). Se trata por tanto de una prueba psicoacústica que requiere la colaboración del paciente.

Tras la administración de cisplatino aparece una disminución de los umbrales auditivos, inicialmente en frecuencias agudas (Fig. 4). A medida que avanza el tratamiento se va produciendo un daño progresivo a nivel coclear, afectándose también las frecuencias graves. La pérdida de frecuencias por encima de 2000 Hz puede afectar a la comprensión de la palabra en ambientes ruidosos, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes con presbiacusia (pérdida de audición asociada con la edad). Como se ha mencionado en el

apartado 1.1.4.4.1, incluso pérdidas en la extensión en altas frecuencias puede producir alteraciones en la percepción de ciertos fonemas, la localización del sonido y en general alterar la inteligibilidad de la palabra y la calidad de vida del paciente (Rodríguez-Valiente y cols., 2009).

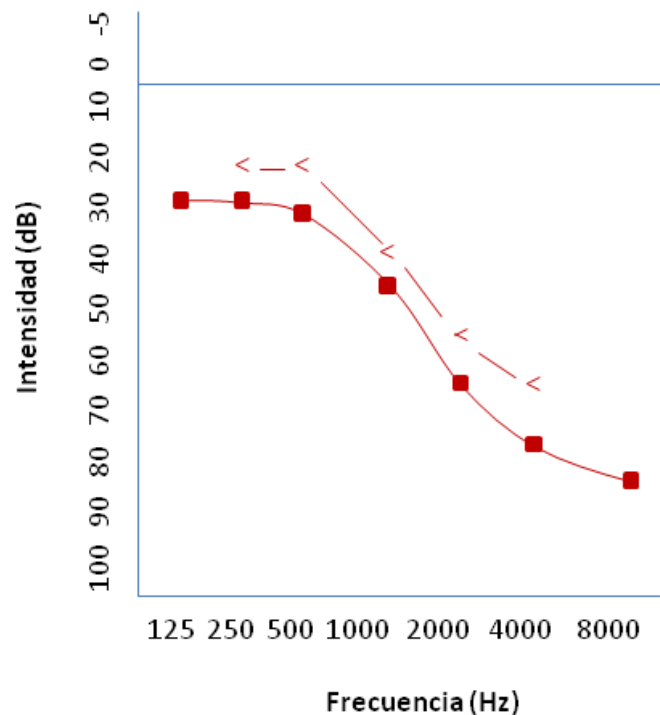


Figura 4. Representación de una audiometría tonal liminar. En la barra de ordenadas se representa la intensidad (dB) y la frecuencia (Hz) de un registro de hipoacusia de tipo neurosensorial. La línea continua representa la vía aérea y la línea discontinua representa la vía ósea.

Otoemisiones acústicas

Las otoemisiones son registros de la actividad mecánica de las células ciliadas externas, que generan sonidos característicos que son recogidos en el conducto auditivo externo. Pueden ser de dos tipos: espontáneas si aparecen en ausencia de un estímulo previo, o bien provocadas, cuando son secundarias a estímulos externos (de tipo "clic" o *tone burst*) (Fig. 5). Dentro de este último tipo se encuentran los productos de distorsión, resultado de la estimulación de las células con dos tonos continuos de forma simultánea, generándose un tercer tono por las células ciliadas externas.

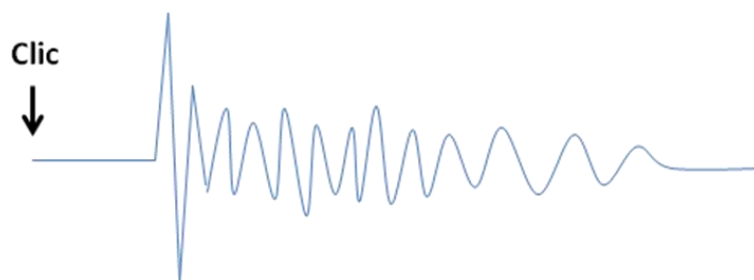


Figura 5. Representación gráfica de un registro de otoemisiones acústicas tras la aplicación de un estímulo tipo "clic".

Las otoemisiones acústicas se alteran de forma precoz en pacientes que reciben tratamiento con cisplatino, detectándose cambios en las mismas tan sólo 24h tras su administración.

Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)

Los PEATC permiten evaluar de manera objetiva la actividad neuronal del sistema auditivo, desde la cóclea hasta el cerebro. A través de la colocación de cuatro electrodos superficiales podemos registrar la actividad eléctrica de parte de la vía auditiva tras la exposición a un estímulo sonoro.

Existen varios tipos de potenciales evocados auditivos según la latencia de la respuesta eléctrica:

- Microfónicos cocleares: representan la actividad eléctrica coclea (sin latencia).
- Electrocoqueografía: 1-4 ms.
- PEATC: 2-12 ms.
- Potenciales evocados auditivos de estado estable
- Potenciales de latencia media: 15-50 ms.
- Potenciales de latencia larga: 50-300 ms

Los PEATC representan la activación de la vía auditiva central correspondiente a la sinapsis entre células ciliadas y nervio coclear; el nervio coclear; y las vías del tronco encefálico. Por las características mecánicas y físicas del estímulo que se utiliza, los PEATC hacen una estimación de la audición existente entre 2.000 y 4.000 Hz.

Un ordenador amplifica la respuesta y la representa mediante una sucesión de distintas ondas. El estímulo acústico pueden ser *clicks* o una breve presentación de tonos puros a distintas intensidades. El resultado son seis ondas, de las que la más constante es la onda V (Fig. 6).

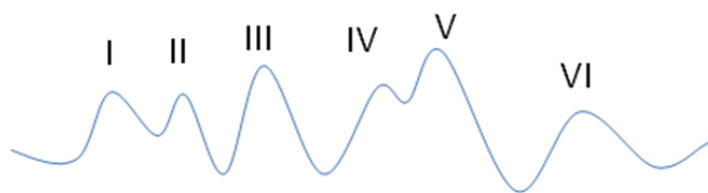


Figura 6. Representación gráfica de los Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral (PEATC). Se diferencian las seis ondas principales del registro.

A día de hoy aún existe discrepancia en los textos científicos sobre la correlación anatómica de cada una de estas ondas. Una posible aproximación podría ser la siguiente:

| | |
|------------------|--------------------------|
| <i>Onda I:</i> | actividad coclear |
| <i>Onda II:</i> | nervio auditivo |
| <i>Onda III:</i> | núcleo coclear |
| <i>Onda IV:</i> | complejo olivar superior |
| <i>Onda V:</i> | lemnisco lateral |
| <i>Onda VI:</i> | colículo inferior |

Durante el tratamiento con cisplatino la morfología de estas seis ondas se ve alterada. La pérdida de audición que genera la administración de este fármaco es de tipo neurosensorial. Por ello, en el registro, además de la ausencia de ondas, especialmente de la onda V a intensidades bajas, existe un alargamiento de las interlatencias (distancia entre las ondas de un mismo registro).

Potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAee)

Los potenciales de estado estable registran la respuesta cerebral tras la estimulación sonora con un tono modulado en amplitud. Este tono modulado significa que puede aumentar o disminuir para cada frecuencia, permitiendo evaluar una parte del espectro auditivo mayor que los PEATC. Con esta técnica se consiguen registros estables en el tiempo, dado que se producen de forma paralela al estímulo que las genera. Además proporciona información específica y objetiva para cada frecuencia estudiada, pudiendo representarse la afectación de la audición en diferentes frecuencias de una forma parecida a la audiometría tonal liminar.

El resultado gráfico obtenido se asemeja estructuralmente al de la audiometría convencional empleada habitualmente en la práctica clínica (Fig. 7).

El tratamiento con cisplatino produce una alteración en el registro de los potenciales de estado estable. La hipoacusia de tipo neurosensorial que se produce tras la administración del cisplatino genera un empeoramiento inicial en las frecuencias más agudas del espectro auditivo, como se representa en rojo en la figura 7.

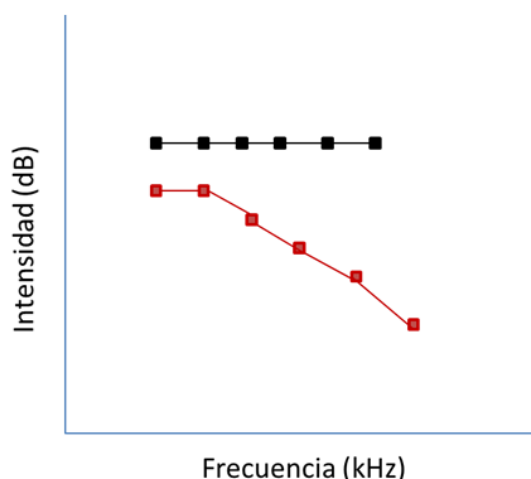


Figura 7. Representación de los Potenciales Evocados Auditivos de Estado Estable (PEAee). En la figura se observa el registro en cada frecuencia (kHz) y a cada intensidad (dB) de una audición normal (negro) y de un registro de hipoacusia neurosensorial (rojo).

Control de la función vestibular

La monitorización de la función vestibular ante la lesión tóxica del cisplatino se realiza mediante la exploración de las respuestas vestibulo-oculares, realización de pruebas rotatorias, posturografía dinámica y videonistagmografía. Debido a la infrecuente aparición de estos síntomas tras el tratamiento con cisplatino estas pruebas no se realizan de forma rutinaria.

1.1.4.4.3 FISIOPATOLOGÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO

El mecanismo por el cual el cisplatino produce ototoxicidad es similar al que permite su efecto curativo antitumoral. Estos mecanismos han sido intensamente investigados, sin obtenerse resultados concluyentes hasta la fecha. Son muchas las teorías y los hallazgos evidenciados a nivel molecular tras el tratamiento quimioterápico. Las estrategias de otoprotección deberían actuar sobre distintos puntos de la cascada molecular con el fin de frenar la apoptosis celular.

A nivel histológico el cisplatino produce una contracción celular, una condensación de cromatina, y la fragmentación del ADN de doble cadena en ADN monocatenario (ssADN). Estos efectos lesivos sobre el ADN permiten interrumpir la mitosis de las células neoplásicas, que por su elevado ritmo de multiplicación son especialmente sensibles al efecto del cisplatino. Los mecanismos reparativos del ADN se activan y finalmente acaban desencadenando la apoptosis de las células tumorales. Secundariamente, algunos tejidos sanos, muy activos metabólicamente, también sufren los efectos de estas lesiones del ADN.

En el caso del oído interno, se pueden encontrar acúmulos de platino en el ADN de los núcleos de las células marginales de la estría vascular, provocando su deterioro funcional y su destrucción apoptótica. El daño de estas células marginales genera una disminución de la captación de potasio (K^+) en la estría vascular produciendo una alteración de la secreción de K^+ en la endolinfa y una disfunción y pérdida de células ciliadas.

Una vez en el interior de la célula, el cisplatino (Fig. 8):

- ✓ Se une a las bases de guanina del ADN y a las proteínas celulares, creando uniones irreversibles inter e intra-catenarias (Casares y cols., 2012 (*Anexo 1*); Ramírez-Camacho y cols., 2008; Jamieson y cols., 2005) (Apartado 1.4.2).
- ✓ Induce una disfunción mitocondrial (Devarajan y cols., 2002).
- ✓ Inicia la cascada inflamatoria (Casares y cols., 2012).
- ✓ Reduce la acción de la peroxidasa coclear de la NADPH NOX3 (Oxidasa (homólogo 3) de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfatasa) y los niveles de glutathione reductasa (Rybak y cols., 1995).
- ✓ Aumenta la tasa de peroxidación lipídica (Teranishi y cols, 2001) y el flujo de Ca^{2+} (Casares y cols., 2012).
- ✓ Induce la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), conduciendo a través de diferentes vías de activación a la apoptosis celular (fig. 8)(Casares y cols., 2012; Rybak y cols., 1997).

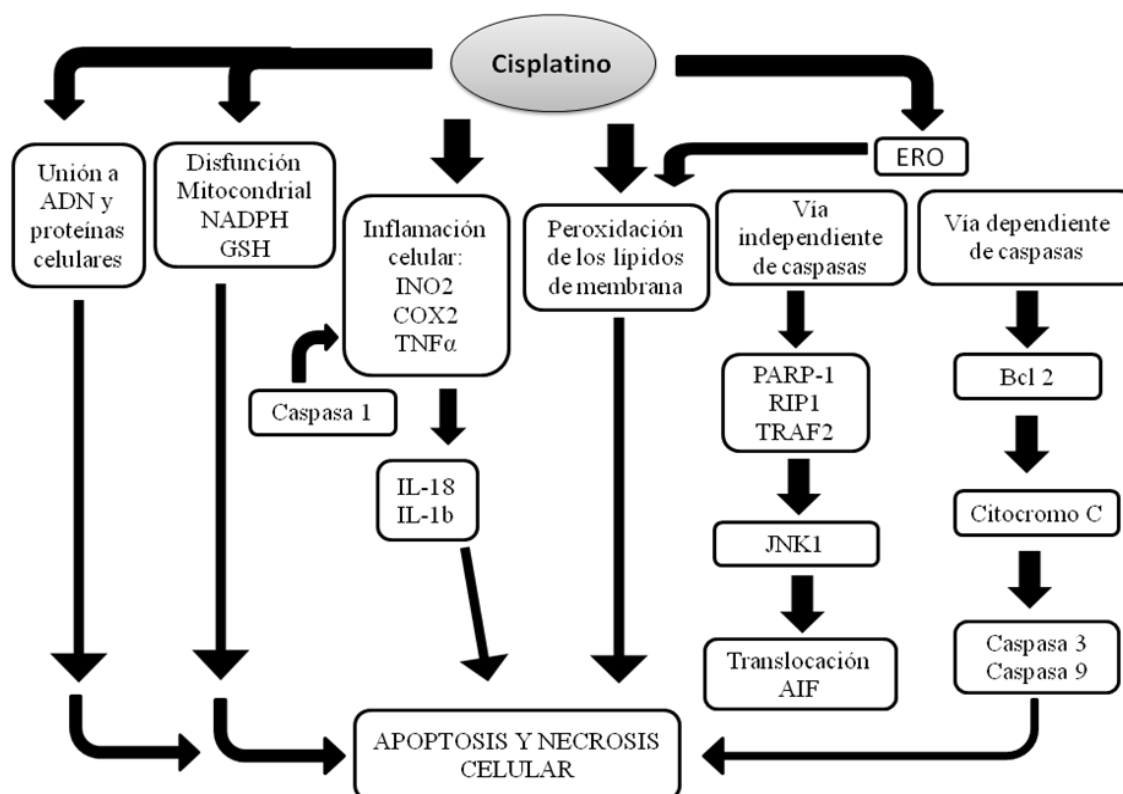


Figura 8. Esquema general de los mecanismos de muerte celular mediada por la acción del cisplatino.

Una de las líneas de investigación más desarrollada en la actualidad frente a la ototoxicidad por cisplatino se centra en el empleo de diversas sustancias que antagonicen la acción de las ERO en diferentes puntos de la cascada molecular (fig. 9).

El empleo de sustancias antioxidantes como agentes otoprotectores se ha extendido en los últimos años, buscando estrategias terapéuticas que favorezcan el sistema de defensa antioxidante y frenen así la cascada apoptótica.

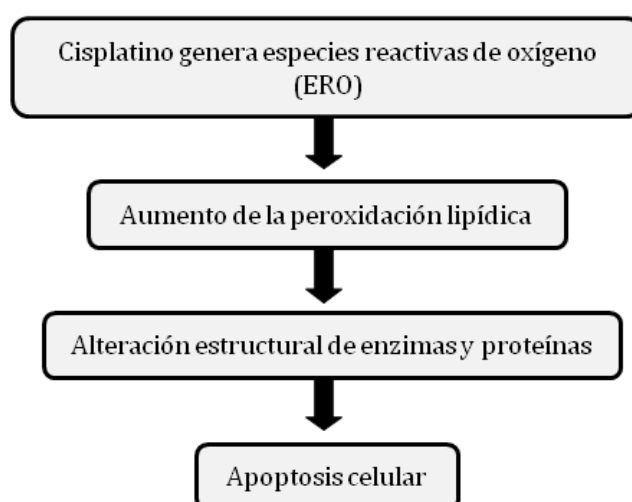


Figura 9. Esquema general de la apoptosis mediada por liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tras la administración de cisplatino.

Estudios recientes han identificado la isoforma NOX3 de NADPH oxidasa como la principal fuente de generación de ERO inducida por cisplatino a nivel coclear. La isoforma NOX3 regula los genes relacionados con el estrés coclear, como el receptor de potencial transitorio vaniloide-1 (TRPV1) y la molécula KIM-1, y es el punto de inicio de la cascada apoptótica (Casares y cols., 2012).

Frente a la agresión externa que producen las ERO, se activan mecanismos de compensación intracelular, liberándose enzimas glutatión y sustancias antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa). El agotamiento del sistema antioxidante hace que aumenten los niveles de ERO dentro de la cóclea, anión superóxido, H_2O_2 y lípidos tóxicos peróxidos, entrando calcio al interior de las células ciliares y produciéndose la apoptosis celular.

La aparición de apoptosis celular mediada por ERO puede ser consecuencia, además de por el TRPV1, por la activación de la vía dependiente de caspasas, de la vía no dependiente de caspasas o por un aumento de la peroxidación lipídica de la membrana celular (Fig. 10).

Peroxidación de la membrana celular. La peroxidación de membrana es debida a la reacción de los radicales hidróxilo de las ERO con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, produciendo 4-hidroxinenal aldehído, extremadamente tóxico para la célula.

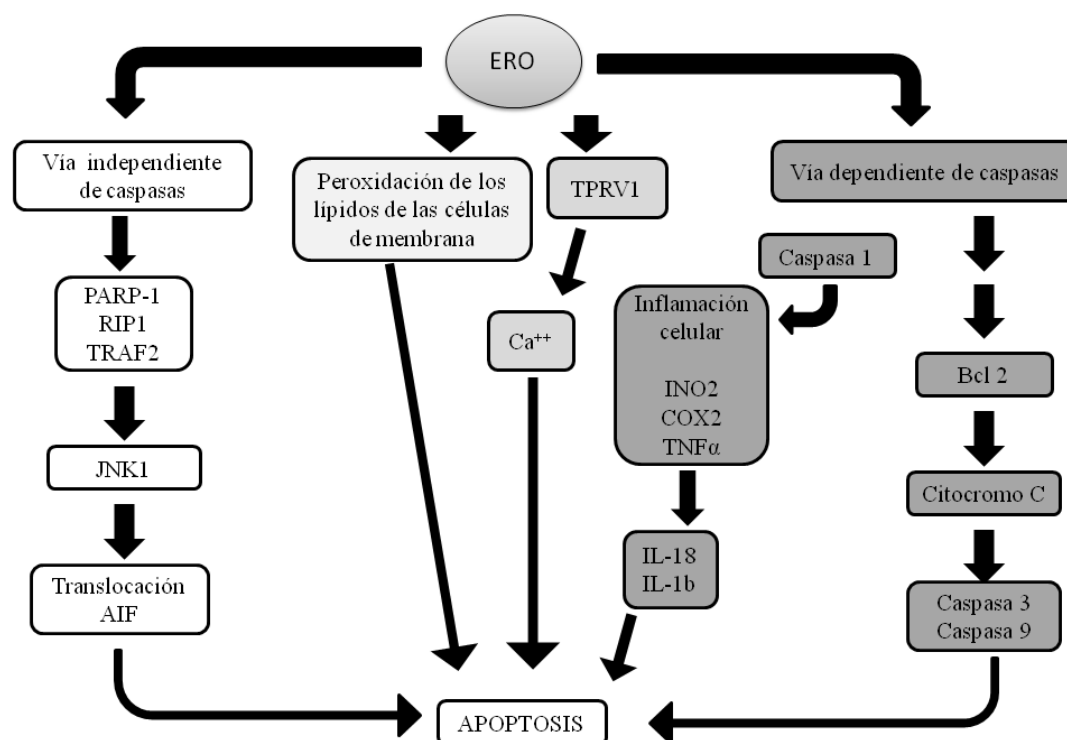


Figura 10. Diferentes vías de apoptosis celular mediadas por especies reactivas de oxígeno (ERO). De izquierda a derecha, vía independiente de caspasas, mediada por peroxidación de los lípidos de las células de membrana, activación de TRPV1, o por la vía dependiente de caspasas. Modificado de Casares C y cols., 2012.

Vía independiente de caspasas. La apoptosis celular se produce a través de la acción de la polimerasa poli ADP-ribosa (PARP-1) sobre la célula. La liberación de las ERO tras la acción tóxica del cisplatino provoca una hiperactivación de la PARP-1. Esta molécula se une a la molécula JNK-1 (c-Jun N-terminal kinasa 1) generando una disfunción mitocondrial intracelular. Esta disfunción activa el factor inductor de la apoptosis celular (AIF), que viaja hasta el núcleo de la célula e induce la fragmentación del ADN (Fig. 11).

Vía dependiente de caspasas. La acción tóxica del cisplatino se lleva a cabo a través de la intervención de los miembros de la familia Bcl-2 (Fig. 12).

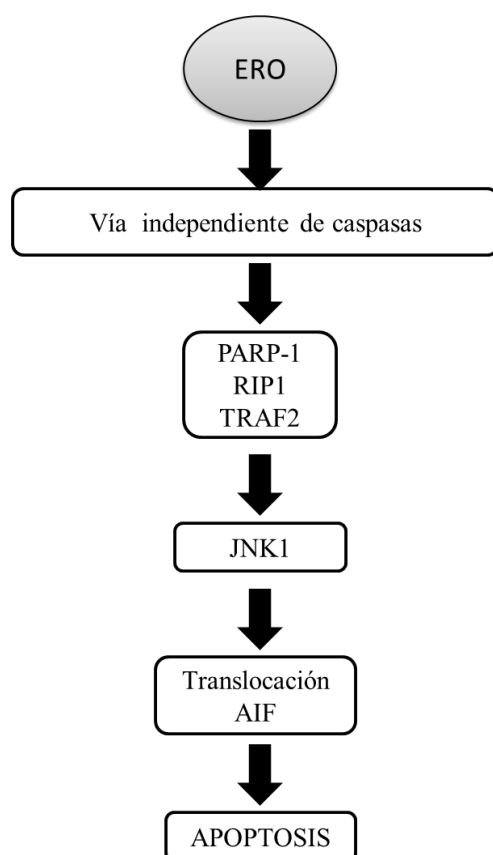


Figura 11. Apoptosis celular a partir de la vía independiente de caspasas. Modificado de Casares C y cols., 2012.

La molécula Bcl-2 tiene la capacidad de activar la procaspasa 9, y esta a su vez a las caspasas 8, 9 y posteriormente a la 3, produciendo una cascada de activación que culmina con la fragmentación del ADN celular. El aumento de las caspasas 3 y 9 como resultado del tratamiento con cisplatino se ha observado al séptimo día tras su administración (Casares y cols., 2013).

El empleo de inhibidores de caspasas 3 y 9 reduce el grado de apoptosis celular y por consiguiente el grado de pérdida auditiva. Este hecho hace que se considere que la administración local de inhibidores de estas caspasas sea una línea prometedora de tratamiento para proteger el oído interno de la acción tóxica del cisplatino sin comprometer su acción terapéutica a nivel sistémico.

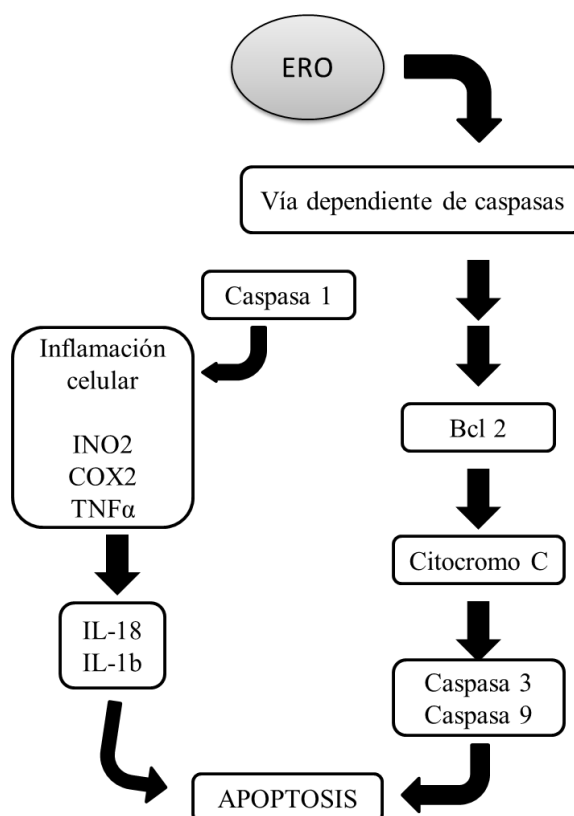


Figura 12. Cascada apoptótica a partir de la vía dependiente de caspasas. Modificado de Casares C y cols., 2012.

Otra caspasa implicada en la acción tóxica del cisplatino mediante la producción de ERO es la caspasa 1. Esta caspasa es también capaz de activar a las caspasas 3 y 9, además de los precursores inactivos de la interleucina 1b (IL-1b) y 18 (IL-18), citocinas que intervienen en la inflamación celular (Fig. 12).

En resumen, existen dos vías intracelulares que desencadenan la apoptosis mediada por cisplatino:

- ✓ A través de cambios electrolíticos celulares (en respuesta a diversas noxas externas).
- ✓ Mediante mecanismos inflamatorios que contribuyen a la destrucción celular.

Ambas vías podrían estar interrelacionadas. Son necesarios estudios complementarios para determinar el fármaco antioxidante ideal que fuera capaz de frenar esta cascada apoptótica y consiguiera minimizar el efecto ototóxico que ejerce el cisplatino a nivel coclear.

1.2 OTOPROTECCIÓN

1.2.1 CONCEPTO

La otoprotección se puede definir como el conjunto de estrategias de intervención química o física que intentan prevenir y/o tratar el daño auditivo producido por diversas agresiones al oído interno.

En un sentido más restrictivo, se aplica este término al empleo de sustancias químicas involucradas en la interrupción de acontecimientos intracelulares que conducen a la apoptosis de las células sensoriales auditivas.

1.2.2 ESTRATEGIAS ACTUALES

En la actualidad existen estrategias elementales para la prevención del daño auditivo, como son la protección física frente al ruido (mediante mecanismos de barrera como tapones óticos o auriculares), control de niveles plasmáticos de medicamentos ototóxicos y suspensión de la administración del medicamento cuando se detecta ototoxicidad.

Se ha observado una similitud histológica de las lesiones cocleares producidas por contaminación acústica, infecciones, ototoxicidad medicamentosa y presbiacusia (Jiang y cols., 2007). Además, se han encontrado vías moleculares comunes de daño y muerte celular en muchas de estas noxas. Este hecho hace pensar que las sustancias empleadas en la citoprotección frente a otros agentes externos, como el ruido, puedan ser igualmente eficaces frente a la toxicidad medicamentosa (García Callejo y cols., 2011). Un ejemplo de ello es el empleo de corticoides, dados los buenos resultados del tratamiento en hipoacusias neurosensoriales súbitas o rápidamente progresivas (sobre todo si involucran mecanismos de autoinmunidad). Se ha investigado su papel en el tratamiento del daño auditivo por ruido y por ototoxicidad, obteniéndose resultados muy variables y controvertidos.

Por todo ello, aún existe la necesidad de comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares intrínsecos del daño auditivo, en función de la noxa que lo produce, con el fin de conseguir una mejor adecuación de los tratamientos disponibles.

1.2.3 AGENTES EMPLEADOS

1.2.3.1 AGENTES QUÍMICOS

Existe una gran variedad de sustancias empleadas en estudios de otoprotección: sustancias antioxidantes, sustancias no antioxidantes, sustancias antiinflamatorias, inhibidores de ARN, etc. La mayoría de estos estudios han sido realizados en modelos de experimentación animal utilizando sustancias que actúan sobre puntos comunes de la cascada molecular que conduce al daño neurosensorial:

1. Evitando la entrada del agente ototóxico en el oído interno o en la célula coclear.
2. Inhibiendo las señales proapoptóticas intracelulares (y potenciando la acción de protectores endógenos celulares).
3. Aportando moléculas antioxidantes que previenen la acción de las ERO.

Debido a la implicación de las ERO en la ototoxicidad, los agentes antioxidantes se postulan como buenos candidatos frente a la acción de sustancias como el cisplatino y los aminoglucósidos.

Hasta el momento, dos sustancias antioxidantes han obtenido resultados satisfactorios frente a la ototoxicidad por aminoglucósidos en ensayos clínicos: la aspirina (Sha y cols., 2006; Behnoud y cols., 2009) y la N-acetilcisteína (Feldman y cols., 2007). Otras sustancias con propiedades antioxidantes, como la vitamina E, a pesar de haber alcanzado niveles de otoprotección en cobayas, no producen en humanos una protección significativa frente a la acción ototóxica de los aminoglucósidos (Kharkheli y cols., 2007).

Frente a los ensayos clínicos, se han investigado una mayor variedad de sustancias en estudios experimentales en modelos animales de ototoxicidad por cisplatino. Con el fin de recoger los resultados obtenidos por las mismas, y en especial por las sustancias antioxidantes, se ha realizado en la presente tesis doctoral una revisión bibliográfica de los estudios experimentales realizados en roedores, evaluando los resultados funcionales e histológicos alcanzado en cada uno de ellos (Material y Métodos, sección 3.3, página 72) (*Anexo II*).

1.2.3.2 AGENTES FÍSICOS

Aunque mucho menos empleados que los químicos, se han utilizado algunos agentes físicos como preconditionamiento a la exposición de sustancias ototóxicas como el cisplatino o los aminoglucósidos.

Se ha observado que la exposición a **ruido** previa a la administración de sustancias ototóxicas *in vivo* confiere una protección frente a la hipoacusia inducida por las mismas (Roy y cols., 2013). Esta protección auditiva se obtiene mediante la activación de la respuesta al estrés térmico mediada por las proteínas de choque térmico (HSP) (Cunningham y Brandon, 2006). Las proteínas HSP son proteínas producidas por las células de organismos tanto unicelulares como pluricelulares en respuesta a un estímulo estresante. El preconditionamiento con sonido produce una activación de las proteínas HSP, activándose tanto la Hsp32 (hemoxigenasa-1) como la HSP70 (HSP de 70KDa). Se ha estudiado la activación de la proteína HSP70 en respuesta a la isquemia coclear, a la exposición a cisplatino

y a la exposición a ruido (García-Berrocal y cols., 2010; Oh y cols., 2000). En un estudio de 2006 (Cunningham y Brandon, 2006) se evalúa el papel que desempeña la presencia de HSP70 en las células del utrículo de un ratón adulto. El utrículo del ratón se sometió a un proceso de choque térmico en el que se produjo la activación de las proteínas HSP. Como resultado se evidenció una disminución de la muerte celular en los cultivos que a continuación eran expuestos a neomicina o cisplatino, frente a los que no recibieron el choque térmico previo.

En el trabajo de Roy y cols., del año 2013 se preconditionó con ruido a ratones que iban a recibir tratamiento con cisplatino o kanamicina. Los niveles de HSP fueron analizados mediante PCR. Se observó que la activación de las proteínas HSP producía una disminución de la pérdida de audición provocada por los fármacos aminoglucósidos y por el cisplatino, disminuyendo del mismo modo la muerte de las células del oído interno.

La administración de **oxígeno hiperbárico** consiste en la realización de inhalaciones intermitentes de oxígeno 100% a una presión superior a 1 atmósfera. Este tratamiento ha sido utilizado como terapia adyuvante en infecciones de tejidos blandos, lesiones por radiación, gangrena gaseosa y enfermedades por descompresión. Recientemente se ha probado su uso en experimentación animal como adyuvante frente a la ototoxicidad producida por cisplatino, debido a su actividad antioxidante. Yassuda y cols. en el año 2008 valoraron su eficacia en chinchillas tratadas con oxígeno hiperbárico tras la administración de cisplatino. El análisis histológico coclear mostró que los animales tratados con esta técnica presentaron una disminución de la lesión producida por cisplatino sobre las células ciliadas externas, aunque la valoración funcional mediante otoemisiones acústicas no demostró una mejoría significativa tras el tratamiento.

1.2.3.3 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Existen diferentes vías de administración de las sustancias otoprotectoras: oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular e intratimpánica. Salvo la vía intratimpánica, el resto de vías se engloban en el término genérico de vías de administración sistémica.

Vía de administración sistémica. Al utilizar esta vía el agente protector antagoniza el efecto tóxico tanto a nivel del oído interno como sobre otros órganos y sistemas. En el caso concreto del cisplatino, la administración sistémica del otoprotector ejercería una acción antagonista a nivel auditivo, protegiendo el oído interno del daño celular, pero también a nivel sistémico, pudiendo interferir con su efecto antitumoral (Blakley y cols., 2001).

Para que un agente protector pueda ser administrado por vía sistémica en los estudios de ototoxicidad por cisplatino, ha de cumplir una serie de características; no ha de ser tóxico

per se para ningún órgano, ha de alcanzar concentraciones suficientemente altas en el oído interno para protegerlo de la lesión por cisplatino y no debe interferir con el efecto antitumoral del mismo.

Vía de administración intratimpánica. Permite una protección selectiva del oído interno, ejerciendo el efecto del agente protector a nivel local, evitando los efectos secundarios del fármaco a nivel sistémico (Light and Silverstein, 2004). Además, se ha observado con algunos fármacos como los corticoides que las concentraciones alcanzadas en el oído interno son mucho más altas tras la administración intratimpánica que cuando la administración ha sido sistémica (Paksoy y cols., 2011). Por ello, desde nuestro punto de vista, es la vía de elección para el estudio de fármacos otoprotectores frente a la ototoxicidad por cisplatino.

Sin embargo, la utilización de la vía intratimpánica también presenta una serie de limitaciones. La concentración del fármaco que accede a la cóclea tras su aplicación es poco estandarizable (parte se absorbe en el oído medio y parte se pierde a través de la trompa de Eustaquio, pasa al torrente sanguíneo o al acueducto coclear), y requiere de la realización de estudios farmacocinéticos para poder valorar la difusión del fármaco desde el momento de su administración hasta su presencia en el medio líquido que rodea las células del oído interno.

1.2.4 MODELOS PRECLÍNICOS EN OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO

1.2.4.1 CULTIVOS CELULARES

Los estudios de ototoxicidad en experimentación animal presentan algunas limitaciones, como la dificultad de controlar las condiciones ambientales de las células del oído interno, la escasa cantidad de tejido disponible y los posibles efectos secundarios de los fármacos testados en el animal de experimentación. Por ello algunos estudios de ototoxicidad han sido realizados en explantes de órganos cocleares y vestibulares (Richardson y Russel, 1991; Kotecha y Richardson, 1994; Löwenheim y cols., 1999).

Los cultivos organotípicos no son fáciles de establecer y el requerimiento de numerosos explantes para cada condición experimental limita el alcance de esta técnica. Las líneas celulares derivadas del órgano de Corti e inmortalizadas en entornos manipulados de forma sistemática son una valiosa alternativa. Al ser sensibles a las drogas ototóxicas administradas podrían facilitar el estudio de los mecanismos moleculares de ototoxicidad, así como ayudar a diseñar mejores estrategias para prevenir la pérdida de audición neurosensorial inducida por estos fármacos. Por otra parte, en cuestión de horas o días, dependiendo del ensayo biológico seleccionado, muchos medicamentos diferentes podrían evaluarse de forma simultánea y en diferentes concentraciones, aumentando la

productividad, disminuyendo los costes y evitando los problemas éticos asociados con la investigación animal.

El establecimiento de líneas celulares inmortales ha sido facilitado por el desarrollo de un ratón transgénico, Immortomouse, que alberga una mutación del gen del antígeno T grande del SV40 sensible a cambios de temperatura bajo el control de un promotor inducible por interferón- γ (Holley y Lawlor, 1997). Varias líneas celulares, tanto cocleares como vestibulares, han sido desarrolladas a partir del modelo del Immortomouse (Barald y cols., 1997; Rivolta y cols., 1998; Kalinec y cols., 1999; Lawlor y cols., 1999; Bertolaso y cols., 2001 y Boeda y cols., 2001).

En el estudio de Kalinec y cols. (2003) se describe el proceso de clonación y caracterización de una nueva línea celular denominada HEI-OC1 (House Ear Institute-organ of Corti 1), derivada de cultivos celulares de cócleas de Immortomouse. Las células HEI-OC1 expresan varios marcadores moleculares característicos de las células sensoriales del órgano de Corti y son extremadamente sensibles a los fármacos ototóxicos, siendo un excelente sistema para la evaluación *in vitro* de los mecanismos celulares y moleculares que envuelven los procesos de ototoxicidad, y para valorar el papel ototóxico u otoprotector de nuevas sustancias. Actualmente ha sido empleada en varios modelos de ototoxicidad por cisplatino con buenos resultados (Lee y cols., 2015; Choi y cols., 2014; Chang y cols., 2014; Shin y cols., 2013), por lo que es la línea celular elegida para realizar la evaluación de luteína sobre las células del oído interno en la presente tesis doctoral.

1.2.4.2 MODELOS ANIMALES

La utilización de modelos animales en investigación biomédica está ampliamente extendida. Los modelos animales más empleados en los estudios de ototoxicidad por cisplatino son los roedores, y en especial las diferentes especies de rata. La utilización de roedores en este tipo de estudios está justificada por presentar una gran similitud de su genoma con el del humano (Copeland y cols., 1993), así como en la anatomía e histología del oído medio y del oído interno (Albiin y cols., 1986 y Wysocki y cols., 2005).

El modelo experimental con ratas Wistar ha sido validado en tesis doctorales anteriores del servicio de otorrinolaringología del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda. Se trata de un modelo de experimentación animal ampliamente utilizado en investigación otológica, tanto en estudios realizados en el oído medio como en el oído interno. Este modelo ha sido también aceptado como eficaz para el estudio de la ototoxicidad por cisplatino, observándose que con dosis únicas de 5-10 mg/kg de cisplatino se producían cambios histológicos y auditivos en el oído interno de la rata Wistar similares a los descritos en seres

humanos (Ramírez-Camacho y cols., 2008; García-Berrocal y cols., 2010; González-García y cols., 2010).

En años recientes también se está empleando el modelo animal no mamífero de pez cebra en estudios de ototoxicidad (Coffin y cols., 2010; Hirose y cols., 2011; Namdaran y cols., 2012; Ou y cols., 2010). El pez cebra es un valioso modelo para el estudio del desarrollo de las células ciliadas, su estructura, genética y comportamiento ante distintas noxas externas. Al igual que los vertebrados acuáticos tiene células ciliadas en su superficie corporal organizadas en un sistema sensorial llamado línea lateral. La disposición superficial de estas células facilita su visualización en los estudios microscópicos (Chiu y cols., 2008).

1.2.5 EVIDENCIAS CLÍNICAS DE OTOPROTECCIÓN FRENTE A CISPLATINO

Los resultados de otoprotección alcanzados por las distintas sustancias evaluadas en modelos preclínicos no siempre obtienen los mismos resultados en los ensayos realizados en humanos (Schacht J. y cols., 2012).

Según la revisión bibliográfica llevada a cabo por Brock y cols. (2012), sólo dos fármacos antioxidantes han sido probados como sustancias otoprotectoras frente a cisplatino en ensayos clínicos en la edad pediátrica, la aminofostina (Gallegos-Castorena y cols., 2007; Fisher y cols., 2004; Fouladi y cols., 2008; Katzenstein y cols., 2009), y el tiosulfato de sodio (STS) (Doolittle y cols., 2001; Neuwelt y cols., 1998).

Aminofostina

Los pacientes con melanoma metastático tratados con aminofostina previa a la administración de cisplatino no evidenciaron protección frente a la ototoxicidad producida por el mismo (Ekborn y cols., 2002; Marina y cols., 2005; Sastry y Kellie, 2005). La aminofostina produce hipocalcemia como efecto secundario, y no ha demostrado ejercer un efecto otoprotector frente a la acción del cisplatino cuando se utiliza a la dosis sugerida en la ficha técnica. Sin embargo, cuando se emplearon dosis superiores de aminofostina, algunos estudios obtuvieron una reducción del efecto ototóxico del cisplatino en niños con meduloblastoma (Fouladi y cols., 2008). A pesar de esto, en una revisión Cochrane no se encontraron datos que permitieran afirmar, con la evidencia disponible, que la administración de aminofostina sea eficaz en la prevención de la ototoxicidad por cisplatino en la edad pediátrica (van As y cols., 2012; van As y cols., 2014).

Tiosulfato de sodio

Tanto el Children's Oncology Group (COG), como el International Pediatric Oncology Epithelial Liver Tumor Strategy Group (SIOPEL) desde 2012 están realizando estudios

controlados y aleatorizados en niños empleando tiosulfato de sodio (STS) para prevenir la ototoxicidad por cisplatino con el fin de encontrar una estrategia ideal de otoprotección (National Cancer Institute's List of Cancer Clinical Trials). De forma paralela, se está analizando el ADN de las personas que han presentado ototoxicidad por cisplatino, con el fin de poder realizar estudios farmacogenéticos.

Se sabe que el STS puede proteger frente a la nefrotoxicidad producida por cisplatino en humanos (Goel y cols., 1989). Sin embargo, su administración sistémica también podría reducir la actividad antineoplásica del mismo (Howell y Taetle, 1980; Iwamoto y cols., 1985). Los protocolos de quimioradioterapia que emplean cisplatino por vía sistémica incluyen STS como un agente protector, administrándose conjuntamente con el cisplatino durante el tratamiento. En el estudio de Rybak y cols. (2009) 146 pacientes con tumores de cabeza y cuello localmente avanzados recibieron dosis altas de quimioterapia con cisplatino ($150\text{mg}/\text{m}^2$), rescate de tiosulfato de sodio y administración de radioterapia concomitante (70 Gy). En el 23% de los pacientes se registró pérdida de audición moderada-severa que requirió tratamiento protésico complementario al finalizar el ciclo de quimioradioterapia. La dosis acumulada de cisplatino y de radiación, asociado a una edad temprana de inicio del tratamiento se correlacionaron con un aumento de la pérdida auditiva neurosensorial durante y después de la terapia, sin evidenciarse otoprotección por la administración de STS.

Otras sustancias testadas en adultos son la cimetidina, la dexametasona y la N-acetilcisteína.

Cimetidina

La cimetidina es un antagonista del receptor H₂ de la histamina, que ha mostrado cierta protección frente al deterioro auditivo producido por el tratamiento con cisplatino en pacientes con leucemia linfoblástica T (Ciarimboli y cols., 2010). Aunque no se evidenció que la cimetidina produjera interferencia con los resultados antitumorales del cisplatino, se describió que su administración oral podía producir nefrotoxicidad sobreañadida al daño renal producido *per se* por el cisplatino.

Dexametasona

La dexametasona es uno de los agentes más empleados en estudios de experimentación animal frente a cisplatino. Los corticoides, especialmente la dexametasona, se utilizan para tratar patologías auditivas diversas como la hipoacusia súbita, enfermedades inmunomediadas del oído interno, pérdida de la audición inducida por ruido, enfermedad de Ménière, ototoxicidad por aspirina o aminoglucósidos (Himeno, y cols., 2002; Chandrasekhar, y cols., 2000). La presencia de receptores de corticoides dentro de las estructuras del oído

interno del ratón proporciona una prueba más de que los corticoides pudieran ejercer un efecto protector en el oído interno (Hagunani, y cols., 2006). En el año 2014 se realizó un ensayo clínico en pacientes por el grupo de Marshak y cols. Se administró dexametasona trastimpánica (en uno de los oídos, sirviendo el otro oído como control) a pacientes que recibían tratamiento con cisplatino. Tanto en la audiometría como en los productos de distorsión se evidenció que existía una protección parcial frente al cisplatino en 4 y 8kHz, concluyéndose que su administración tenía mínimos efectos otoprotectores.

N-acetilcisteína

Un reciente estudio de Yoo y cols., publicado en marzo de 2014 evaluaba el efecto protector de la administración trastimpánica de N-acetilcisteína en pacientes tratados con cisplatino. En solo dos de los once pacientes que completaron el estudio se evidenció una conservación auditiva, sin poder obtenerse resultados concluyentes. En concordancia con estudios previos, se ha observado que el tratamiento con N-acetilcisteína previene de la elevación de los umbrales en la audiometría tonal liminar en combinación con cisplatino, pero no obtiene niveles de otoprotección significativa (García Callejo y cols., 2011).

1.2.6 VÍA DE ADMINISTRACIÓN

1.2.6.1 BASES ANATÓMICAS PARA LA ADMINISTRACIÓN INTRATIMPÁNICA

El oído se divide en tres porciones, estructural y funcionalmente diferenciadas: oído externo, oído medio y oído interno (Fig. 13).

El sonido procedente del exterior tiene que atravesar el oído externo y la cavidad aérea del oído medio antes de llegar al oído interno, donde se procesará la información y se enviará al sistema nervioso central.

Desde el oído externo el sonido se transmite hacia el oído interno a través de la vibración de la membrana timpánica y del movimiento de los tres huesecillos del oído medio (martillo, yunque y estribo). Tanto el oído externo como las estructuras del oído medio ejercen una función amplificadora del sonido. El oído interno se ubica en el interior del peñasco y consta de dos porciones, vestibular (equilibrio) y coclear (audición), íntimamente relacionadas; de aquí que cuando un fármaco lesiona el oído interno pueda aparecer tanto pérdida de audición como alteraciones del equilibrio.

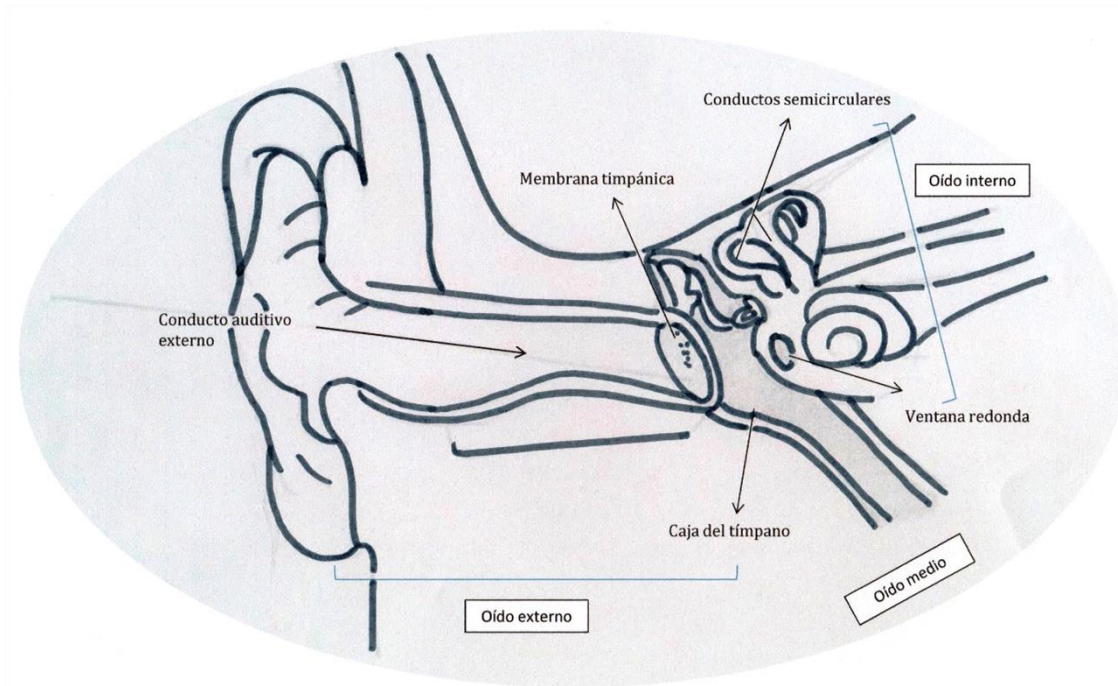


Figura 13. Esquema anatómico de las estructuras del oído externo, medio e interno.

En la cóclea se produce la transformación de la energía mecánica en energía eléctrica. Se trata de una estructura espiral de dos vueltas y media, con una longitud de 35 mm en humanos. Dentro de ella se pueden diferenciar tres compartimentos denominados rampas (vestibular, media y timpánica) (Fig. 14).

El oído interno se comunica con el oído medio a través de dos ventanas la oval y la redonda. Sobre la ventana oval descansa la platina del estribo, desde donde se propaga la estimulación sonora hacia la rampa vestibular. La ventana redonda está cubierta por una fina y flexible membrana que comunica con la rampa timpánica coclear.

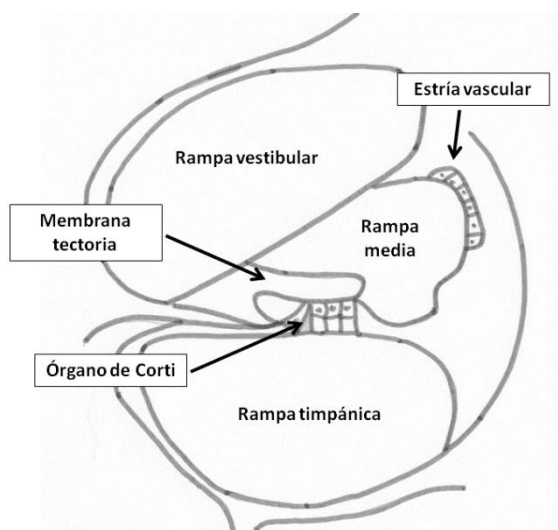


Figura 14. Oído interno. Rampas vestibular, media y timpánica.

El órgano sensorial de la audición (órgano de Corti) se aloja en la rampa media, y se compone de 1 hilera de células ciliadas internas (CCI, unas 3400 células), de tres a cinco hileras de células ciliadas externas (CCE, unas 13.400 células) (Gil Carcedo y cols., 2007), y de células de sostén. La rampa vestibular y timpánica contienen perilinfa, mientras que la rampa media contiene endolinfa. La diferente composición de ambos líquidos permite crear un gradiente electro-químico que permite el paso de sustancias hacia las células ciliadas y contribuye al potencial eléctrico de las mismas.

La vascularización de las estructuras del órgano de Corti proviene de los vasos terminales de la arteria coclear (rama de la arteria cerebelosa inferior), alcanzando las estructuras cocleares a través de la estría vascular.

La aplicación de la sustancia protectora por vía intratimpánica se realiza a través de una punción en la porción postero-inferior de la membrana del tímpano. El paciente se tumba en una camilla con el oído hacia arriba. Una vez introducida la aguja en la cavidad del oído medio, se realiza la introducción del agente protector de forma lenta y progresiva hasta observar, por transparencia de la membrana timpánica, que el líquido rellena por completo la caja, momento en el cual se finaliza la administración. Se trata de un procedimiento sencillo, rápido y prácticamente inocuo. La punción de la membrana timpánica es muy dolorosa debido a la gran cantidad de terminaciones nerviosas presentes, por ello es fundamental realizar una correcta anestesia del conducto mediante gotas óticas anestésicas o infiltración de las paredes del mismo. En animales este procedimiento suele realizarse bajo sedación.

Los principales efectos secundarios de la punción trastimpánica son la otalgia residual y la cefalea o mareo post-punción.

1.2.6.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PASO DE SUSTANCIAS AL OÍDO INTERNO

Desde el oído medio el fármaco administrado ha de difundirse al oído interno. Esta difusión se realiza principalmente a través de la membrana de la ventana redonda (Fig. 15), aunque hay trabajos que describen también el paso de las sustancias administradas por vía intratimpánica a través del ligamento anular de la platina, en la ventana oval (Salt y cols., 2012; King y cols., 2013).

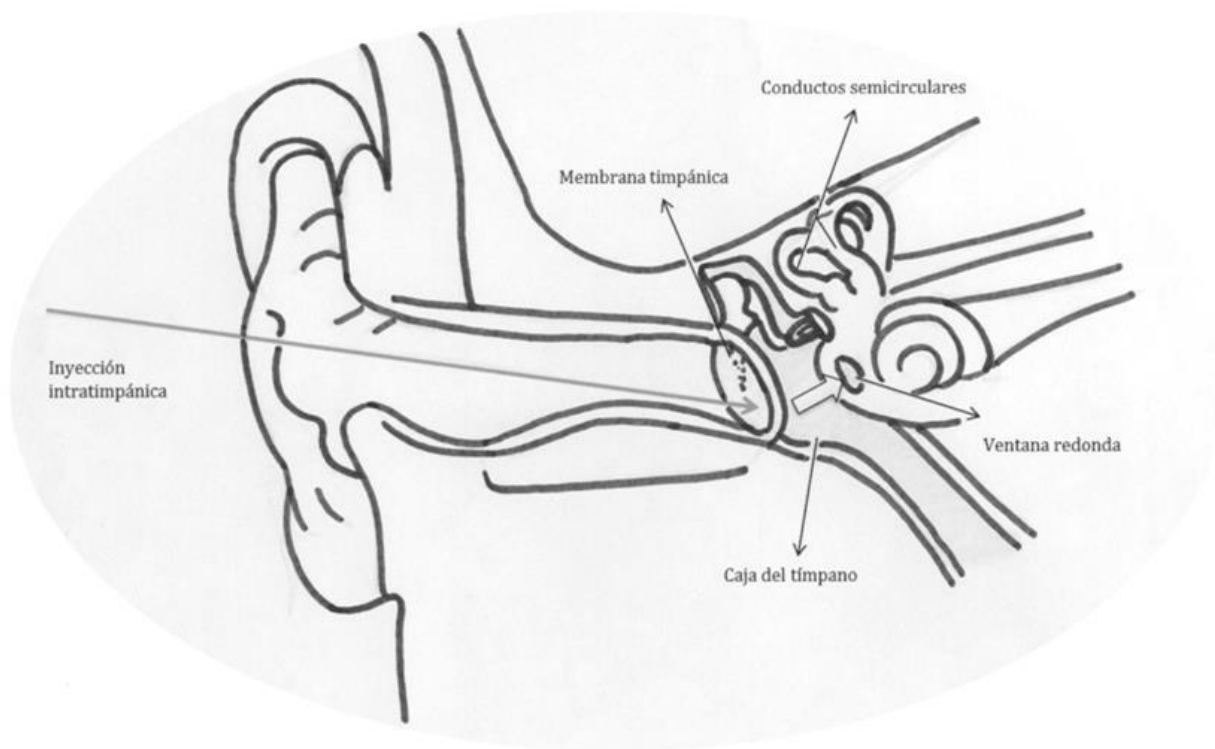


Figura 15. Esquema de la punción trastimpánica. Se observa como se ha de realizar la punción a través del conducto auditivo externo, sin tocar sus paredes (flecha gris), y paso del contenido inyectado al oído interno a través de la membrana redonda (flecha blanca).

Para conseguir que la sustancia administrada alcance una adecuada concentración en el oído interno, es imprescindible que pueda atravesar dichas membranas.

Varios factores contribuyen a la permeabilidad de la membrana de la ventana redonda:

- ✓ **Tamaño de la sustancia.** Se trata de uno de los factores más importantes dado que microsféricas de $1\mu\text{m}$ atraviesan sin problemas la membrana, mientras que por encima de $3\mu\text{m}$ no lo hacen (Juhn y cols., 1988).

- ✓ **Carga eléctrica y morfología.** Cuantas menos irregularidades tenga la sustancia y menor carga eléctrica, más fácil es su difusión.
- ✓ **Peso molecular.** Sustancias de peso molecular inferior a 1000 kD pueden atravesar la membrana rápidamente mientras que las de tamaño superior son transportadas por pinocitosis (Juhn y cols., 1988).
- ✓ **Grosor de la membrana.** En presencia de inflamación ótica el grosor de la membrana timpánica puede aumentar al doble de su estado basal, alterando así la difusión de las sustancias a su través.

1.2.6.2.1 FACILITADORES DE DIFUSIÓN

La permeabilidad de la ventana redonda se puede alterar con el uso de sustancias exógenas adyuvantes, como la histamina (efecto vasodilatador), ácido hialurónico (efecto osmótico) y el dimetil sulfóxido (DMSO) (aumento de la solubilidad de la sustancia en la perilinfa).

El dimetil sulfóxido (DMSO) es uno de los solventes más empleados en los estudios de citotoxicidad coclear y en estudios *in vivo* (Fig. 16). Sólo dos estudios (Qi y cols., 2008 y Uribe y cols., 2013) han evaluado el efecto del DMSO sobre cultivos cocleares, evidenciándose una potenciación de la ototoxicidad del cisplatino cuando se administraba junto con DMSO. Los resultados obtenidos del efecto del DMSO al administrarlo de manera aislada en las células de cultivo fueron contradictorios entre ambos estudios. Su potencial efecto *in vivo* sobre el oído interno no había sido valorado hasta el inicio de los trabajos experimentales de esta Tesis (*Anexo III*).

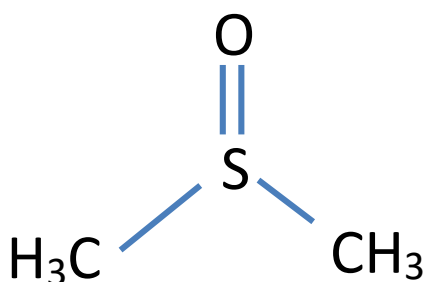


Figura 16. Estructura molecular del DMSO.

El DMSO ha demostrado poseer propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, y es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Se ha utilizado con éxito para tratar trastornos gastrointestinales (Salim, 1992a y 1992b), reumatológicos (Morassi y cols., 1999), urinarios

(McCammon y cols., 1998), pulmonares (Iwasaki y cols., 1994), dermatológicos (Burgues y cols., 1998 y Leite y cols., 2007), y cerebrales (Broadwell y cols., 1982 e Ikeda y Long, 1990).

1.3 LUTEÍNA

1.3.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

La luteína es un compuesto químico perteneciente al grupo de las xantofilas (Fig. 19) con un peso molecular de 568,871 g/mol. Es el segundo carotenoide más frecuentemente encontrado en el suero humano (Khachik y cols., 1997) y está presente en alimentos como maíz, papaya, productos lácteos, cereales, naranjas y verduras de hoja verde oscura, tales como la espinaca y la col rizada (Sommerburg y cols., 1998).

La estructura molecular de la luteína posee dos grupos hidróxilo, uno en cada extremo de la molécula, que son indispensables para su acción biológica antioxidante (Johnson, 2002 and Winkler, 1999) (Fig. 17).

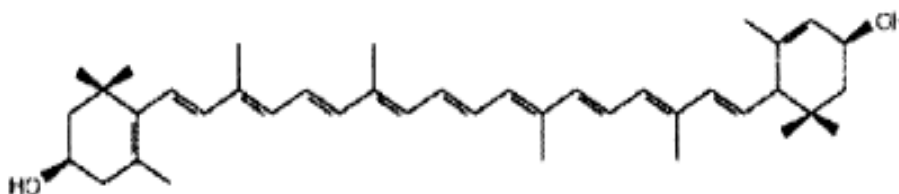


Figura 17. Estructura molecular de la luteína.

1.3.2 APLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES

Se han realizado múltiples estudios acerca de los beneficios de la luteína en humanos. En el momento actual existen varias líneas de investigación que han empleado la luteína con resultados satisfactorios debido a su efecto antioxidante. Los principales trabajos se han realizado en patología cardíaca, cutánea y ocular (Alves-Rodríguez, 2004).

En los últimos años se ha estudiado su implicación en enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, habiéndose observado que unos niveles séricos elevados de luteína y zeaxantina se asocian con un menor riesgo de mortalidad (Min y cols., 2014).

1.3.2.1 ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA CARDIACA

Cada vez hay más evidencia científica que indica que la incidencia de la enfermedad cardíaca coronaria se correlaciona inversamente con el consumo de frutas y verduras. Esto

puede ser debido al alto contenido de antioxidantes en estos alimentos, como las vitaminas A, C, E y los carotenoides.

La presencia de niveles elevados de carotenoides como la luteína se ha relacionado con un índice más bajo de eventos cardiovasculares en la población general (Howard, 1996). Esto sugiere que los antioxidantes de la dieta pueden tener un efecto protector frente a la enfermedad cardiovascular.

Uno de los biomarcadores conocidos en la patogénesis de la aterosclerosis es la presencia de moléculas de adhesión en la superficie celular de las células endoteliales (Kriegelstein y Granger, 2001). Martin y cols. (2000), mostró que el tratamiento de las células endoteliales cultivadas con luteína producía una reducción de la expresión de tales moléculas de adhesión. En el estudio *in vitro* de Dwyer y cols. (Dwyer y cols., 2001) en células de arterias carótidas, se observó que la luteína disminuía la migración de los monocitos inducida por la activación de las moléculas LDL.

1.3.2.2 ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA CUTÁNEA

Los carotenoides actúan como filtros de luz azul de alta energía en las plantas, y en el caso de la luteína en el ojo humano (Britton y cols., 1995; Krinsky y cols., 2002). Se ha propuesto que la luteína podría desempeñar un papel similar en la piel a través de la ingesta o aplicación tópica de dicho compuesto (Dreher y Maibach, 2001; Niles, 2002).

En ratones alimentados con una dieta suplementada con luteína purificada (0,04 o 0,4%, respectivamente) y expuestos a radiación ultravioleta (UVB), se ha observado que existía una disminución significativa de la inflamación de la piel, evidenciándose una relación directa entre la administración de luteína y la protección frente a la radiación ultravioleta (Faulhaber y cols., 2001).

La mayoría de los artículos publicados en la literatura científica demuestran que la administración de luteína en la dieta o como suplemento alimentario es eficaz y segura. El único efecto secundario descrito como consecuencia de la administración de suplementos de luteína en los seres humanos ha sido la carotenodermia (una hiperpigmentación cutánea análoga a la ictericia que es reversible) (Granado y cols., 1998; Olmedilla y cols., 1997 y 2002).

1.3.2.3 ACCIÓN FRENTE A PATOLOGÍA OCULAR

La luteína y el zeaxantina se han encontrado presentes en la mácula y en el cristalino del ojo humano (Landurm y Bone, 2001). Como un tejido altamente vascularizado que posee un alto concentración de ácidos grasos poliinsaturados, la mácula es particularmente susceptible al daño oxidativo (Beatty y cols., 1999). Estas sustancias ejercen una doble

función a nivel ocular; por un lado contribuyen a la filtración de los rayos ultravioleta y por otro ejercen una función antioxidante frente a las ERO producidos por dichas radiaciones.

Varias investigaciones demuestran el aumento de los niveles de luteína en el ojo tras su suplementación por vía oral, e incluso la mejora de la función visual en pacientes que sufren de ciertas enfermedades oculares (Landrum y Bone, 2001, Johnson, 2000, Duncan, y cols., 2002). Estudios observacionales han evidenciado una relación inversa entre la ingesta de luteína y la aparición de patologías oculares, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (Mares-Perlman y cols., 2001), la aparición de cataratas (Olmedilla, y cols., 2003, Gale, y cols., 2001) y de retinosis pigmentaria (Aleman, y cols., 2001).

Se ha propuesto que la luteína y la zeaxantina ayudan a inhibir la formación de drusas y preservar la salud macular al eliminar los radicales libres (Beatty y cols., 2000; Cai y cols., 2000). Esto está apoyado por estudios que emplean modelos *in vitro* de cultivo de células retinianas en las que el tratamiento con antioxidantes, incluyendo zeaxantina y luteína, reducen drásticamente la peroxidación lipídica y la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Cai, y cols., 2000; Sundelin y Nilsson, 2001; Wrona, y cols., 2001).

En los últimos años se han publicado dos metaanálisis que valoran el papel que desempeña la luteína frente a la aparición de degeneración macular y cataratas. En el trabajo de Evans y Lawrenson del año 2012 se realizó una comparación de los resultados obtenidos en estudios aleatorizados y controlados respecto al desarrollo de degeneración macular, en pacientes tratados con carotenoides por vía oral frente a pacientes no tratados. En dicha revisión se concluye que no hay evidencia de que la suplementación con antioxidantes como la vitamina C, luteína o zeaxantina retrase la aparición de degeneración macular. En contrapartida, el trabajo de Liu y cols. del año 2014 sí que obtiene resultados beneficiosos del tratamiento con luteína en la prevención de cataratas. En este metaanálisis se ha valorado la asociación entre los niveles de luteína en sangre y la disminución del riesgo de formación de cataratas asociado a la edad, evidenciándose que ante la presencia de niveles altos de luteína y zeaxantina existía una disminución del riesgo de aparición de cataratas. Esta asociación solo se encontró en la formación de cataratas nucleares (opacificación central del cristalino), y no en cataratas corticales.

Una vez expuestos los beneficios que posee la luteína sobre ciertos procesos oculares, merced a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, las bases fisiopatológicas para su uso en la ototoxicidad por cisplatino son obvias. Además, existen ciertas **características comunes entre el tejido retiniano y el de oído interno**, y no solo por poseer un origen

embriológico común. Las células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) y las células fotorreceptoras tienen una estructura muy similar a las células ciliadas del oído interno. Todas estas células poseen regiones de amplificación de membrana plasmática denominadas microvellosidades en las células de RPE, membranas de disco en las células fotorreceptoras y estereocilios en células ciliadas (Tombran-Tink, y cols., 2007). Existe una organización planar polarizada en las células de ambos órganos. Esta polaridad según el plano de movimiento de las expansiones de membrana plasmática es esencial para el desarrollo y función del sistema nervioso. Las mutaciones en los genes responsables de esta polaridad planar resultan en la aparición de ceguera, hipoacusia o trastornos vestibulares. Las mutaciones en proteínas de la retina y el oído interno generan moléculas de igual peso molecular en ambos órganos, apoyando la teoría de la existencia de roles funcionales similares de proteínas presentes en la cóclea y la retina. De hecho existen varias patologías con afectación común del oído interno y la retina a consecuencia de este tipo de alteraciones, como son el síndrome de Usher o el síndrome de Susac. Algunos análisis bioquímicos documentan la existencia de estas variaciones similares en las proteínas VLGR1, cadherina 23, y protocadherin 15 entre la cóclea y la retina (Lagziel, y cols., 2009; Zallocchi, y cols., 2012).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es determinar si la administración de luteína es capaz de prevenir la acción ototóxica del cisplatino, tanto en un modelo *in vitro* como en un modelo *in vivo* en rata Wistar.

Objetivos específicos

1. Analizar si el solvente usado para vehiculizar la luteína es ototóxico cuando se administra por vía intratimpánica, tanto aisladamente como en combinación con cisplatino intraperitoneal.
2. Comprobar si la luteína tiene un efecto ototóxico intrínseco cuando se administra aisladamente por vía intratimpánica.
3. Evaluar si la aplicación intratimpánica de luteína es capaz de proteger del daño auditivo provocado por cisplatino, mediante pruebas funcionales y estudios histológicos.
4. Identificar el paso de la luteína al oído interno tras su aplicación en el oído medio, cuantificando la cantidad de esta sustancia que está presente en el líquido perilinfático tras su administración.
5. Comparar el potencial efecto protector de la luteína con el alcanzado por otras sustancias, tanto antioxidantes como no antioxidantes, valoradas en modelos de ototoxicidad por cisplatino en roedores en los últimos años.
6. Sugerir, según nuestros resultados y los de otros autores cuáles son las características ideales que debe poseer un fármaco candidato a ser usado como protector frente a cisplatino.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de evaluar el papel de la administración de luteína en la otoprotección frente a cisplatino, se realizó un estudio experimental *in vitro* en cultivos celulares HEI-OC1 y un estudio *in vivo* utilizando un modelo animal en rata Wistar (*Anexo IV*).

Adicionalmente, se realizó una búsqueda bibliográfica y de estudios de otoprotección frente a cisplatino en modelos animales mamíferos, y se comparó el efecto de la administración intratimpánica de luteína con el alcanzado por otras sustancias empleadas en los últimos años en estudios de ototoxicidad por cisplatino en roedores, con especial énfasis en las sustancias antioxidantes.

3.1 CULTIVOS CELULARES

Los modelos *in vitro* permiten un control directo de las concentraciones de los ototóxicos y de los potenciales protectores, razón por la que son utilizados en múltiples estudios de otoprotección. Son asimismo muy productivos, ya que permiten estudiar múltiples sustancias a la vez, o la misma sustancia a diferentes concentraciones.

Los cultivos organotípicos son muy difíciles de establecer en el caso del oído interno. Se precisan muchos animales de experimentación para lograr un cultivo organotípico viable y esto limita la utilidad de esta técnica.

El desarrollo del Immortomouse, un ratón transgénico que porta una mutación del gen del antígeno T SV40 sensible a la temperatura bajo el control de un promotor inducible por interferón- γ , ha permitido la obtención de líneas celulares inmortales. Desde los años 90 se establecieron varias líneas celulares tanto cocleares como vestibulares, pero la línea más empleada desde comienzos del siglo XXI es la obtenida por Federico Kalinec. Esta línea se denomina HEI-OC1, expresa varios marcadores moleculares típicos de las células ciliadas del órgano de Corti, y es muy sensible a ototóxicos, por lo que se ha convertido en la línea celular de elección en estudios de ototoxicidad y otoprotección.

3.1.1 LÍNEA CELULAR HEI-OC1

La línea celular HEI-OC1 del ratón Immortomouse® (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se extrae en el 7º día postnatal y se cultiva a 33°C en medio basal Eagle modificado (DMEM), que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) y 50 U/ml de interferón- γ , sin antibióticos. Los explantes cocleares son trasladados a un medio con condiciones no permisivas (39°C) en diferentes períodos de tiempo, obteniéndose su diferenciación celular hasta los 180 días. Se realiza una evaluación diaria de los cultivos celulares mediante la utilización del microscopio óptico por contraste de fase y las células que crecen en las regiones

correspondientes al órgano de Corti del animal se individualizan y aíslan con la utilización de una micropipeta tras la incubación de los explantes durante 2-5 minutos con tripsina-EDTA.

Esta línea celular se clona utilizando el método de dilución limitante y se caracteriza mediante microscopía de contraste de fase, Western blot e inmunofluorescencia. No se utilizan antibióticos en ningún paso del proceso de la clonación celular. Las células HEI-OC1 expresan marcadores moleculares característicos de las células sensoriales del órgano de Corti (hormona α tiroidea, factor neurotrófico cerebral, calbindina, calmodulina, conexina 26, Math 1, miosina 7a, proteína 2 del órgano de Corti, receptores B y C de la tirosina quinasa, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y prestina) y son extremadamente sensibles a fármacos ototóxicos (Kalinec y cols., 2003). La línea celular utilizada en la presente Tesis Doctoral fue un obsequio del profesor F. Kalinec (Auditory Cell Biology Laboratory, UCLA) y tras su recepción se cultivó a 33°C en DMEM, que contiene 10% de FBS, 5% de L-glutamina y penicilina-G en un incubador humidificado con un 10% de CO₂.

3.1.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El AlamarBlue® (Invitrogen) es un indicador probado de viabilidad celular que emplea el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina en su variante fluorescente, la resorufina. El componente activo, la resazurina, es un compuesto no tóxico de color azul y no fluorescente. Cuando entra en el interior de la célula, la resazurina es reducida a resorufina, que produce una brillante fluorescencia rosada. Las células viables continuamente transforman la resazurina a resorufina, generando así una medida de viabilidad y citotoxicidad. Se midieron las absorbancias a 570 nm en un lector multi-modal de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments; Vermont, USA). Se empleo el solvente de la luteína como grupo control (DMSO 0.5%+PBS). Los tratamientos se replicaron en 8 pocillos por cada tratamiento. Los resultados del experimento se expresan como porcentaje (%) de células viables.

3.1.3 TINCIÓN DE HOECHST

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante la evaluación de la morfología nuclear con tinción de Hoechst 33258. Las células se incubaban durante 20 minutos con 10 mg/ml de la tinción de Hoechst 33258 (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Esta tinción es un pigmento azul fluorescente que tiñe el núcleo celular. Tras lavar dos veces las células con tampón fosfato (PBS), se fijaban con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados en agua destilada, se examinaban las células con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S equipado con un controlador de cámara DS-U82 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands).

3.1.4 ENSAYO DE TOXICIDAD DE LUTEÍNA

Las células HEI-OC1 se sembraron en placas de 96 pocillos, cada uno conteniendo 3×10^4 células. Tras 24 horas de incubación en condiciones permisivas, (33°C y 10% CO_2 en DMEM), se trataron las células con diferentes diluciones de luteína (2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y $100\mu\text{M}$) y se examinó la viabilidad 24 horas después.

3.1.5 ENSAYO DE TOXICIDAD DE CISPLATINO

Las células se sometieron a diferentes diluciones de cisplatino (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 y $60\mu\text{M}$) y se valoró la viabilidad 24 horas después.

3.1.6 EFECTOS DE LA LUTEÍNA FRENTE A CISPLATINO

La línea celular HEI-OC1 se expuso a diferentes concentraciones de luteína (2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y $100\mu\text{M}$) y a $25\mu\text{M}$ de cisplatino durante un período de 24 horas en DMEM sin FBS, para evitar el crecimiento celular incontrolado. El cisplatino se añadió 3 horas después de la administración de luteína para permitir un tiempo suficiente de endocitosis del carotenoide por las células.

La concentración final de luteína utilizada fue de 1 mg/ml. Para obtener dicha disolución se utilizaba DMSO+PBS (Sigma-Aldrich®) como solvente. La mezcla se introducía en un sonicador (aparato que utiliza ultrasonidos para agitar las partículas de una muestra) durante 3-5 minutos hasta obtener su completa disolución.

3.1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron 8 veces por duplicado. Se utilizó el análisis de varianza para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos. El método del análisis de la varianza (ANOVA) se empleó para analizar la significación estadística de los resultados obtenidos. Los valores con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El Tukey test se utilizó para identificar diferencias significativas entre tratamientos pareados. Tanto el procesamiento como el análisis de los datos se realizaron con el software Pro 8 Origen (Origen Lab Corporation, Northampton, EE.UU.).

3.2 ESTUDIO *IN VIVO*

Pese al preciso control de las variables ambientales, y la rapidez y relativa facilidad para realizar estudios de ototoxicidad y otoprotección que proporcionan los cultivos celulares, es imprescindible el empleo de modelos de experimentación animal. Estos modelos permiten evaluar una gran variedad de determinaciones electrofisiológicas, analíticas y terapéuticas. En el Real Decreto 53/2013 se establecen las normas básicas aplicables a la protección de los

animales de experimentación animal, siguiendo el principio de reducción del número de animales utilizados para el estudio, reemplazo de los mismos por estudios *in vitro* siempre que sea posible y el refinamiento de las medidas de mantenimiento y manejo animal. Estas tres características son conocidas como el principio de las 3 "R" y han sido seguidas en el desarrollo del presente estudio experimental.

Los roedores son los animales más utilizados en investigación otológica. Su facilidad de manejo, su relativamente menor coste que otros mamíferos, más grandes, y la presencia de un oído interno similar al del humano y una estructura coclear prominente, facilitan la realización de diferentes procedimientos otológicos, de manera similar a las técnicas empleadas en humanos. En este trabajo se empleó el modelo de rata Wistar.

3.2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 39 ratas hembras Wistar de entre 200 y 250 gramos de peso (Fig. 18). Todas ellas fueron alojadas en el animalario del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Puerta de Hierro, en habitaciones con temperatura controlada, ciclos de luz-oscuridad, y con libre acceso a agua y alimento.



Figura 18. Individuo de rata Wistar.

El estudio fue llevado a cabo de acuerdo con las guías para la investigación animal (Documento BOE-A-2007-19321, ley 32/2007 del Comité Español de Cuidados Animales) y según la regulación Europea 86/609/CEE, y fue aprobado por el Comité de Ética del Bienestar Animal del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro (CEBA 013/2012). Todos los procedimientos quirúrgicos (inyección intratimpánica, extracción del líquido coclear y sacrificio) fueron realizados bajo sedación en los quirófanos experimentales del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro en condiciones de esterilidad.

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.2.1 GRUPOS DE ESTUDIO

La distribución final de los grupos fue la siguiente:

- ✓ *Grupo I (control) (n=5)*: Animales sanos tratados con DMSO 1% intratimpánico en ambos oídos.
- ✓ *Grupo II (control) (n=7)*: Animales tratados con cisplatino intraperitoneal, y DMSO 0,5% intratimpánico en oído derecho y suero salino intratimpánico en el oído izquierdo (control).
- ✓ *Grupo III (control) (n=8)*: Animales sanos tratado con luteína 1mg/ml intratimpánica en oído derecho y suero salino intratimpánico en el oído izquierdo (control).
- ✓ *Grupo IV (estudio farmacocinético) (n=11)*: Animales sanos tratados con luteína intratimpánica en oído derecho, con posterior extracción de perilinfa para determinar la presencia de luteína en la misma. Extracción a los los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 5 días (2 animales por cada subgrupo).
- ✓ *Grupo V (estudio) (n=8)*: Animales tratados con cisplatino intraperitoneal y luteína 1mg/ml intratimpánica y suero salino intratimpánico en el oído izquierdo (control).

La tabla 2 muestra los procedimientos experimentales realizados en cada grupo y el tiempo de supervivencia.

| Grupo | Nº de animales | Procedimientos | Estudio funcional | Estudio morfológico | Tiempo de supervivencia |
|-------|----------------|--------------------------------------|-------------------|--|---------------------------------------|
| I | 5 | DMSO 1% i.t. | Sí | Glutaraldehído oído derecho (n=5) Paraformaldehído oído izquierdo (n=5) | 5 días |
| II | 7 | DMSO 0,5% i.t. + Cisplatino i.p. | Sí | Glutaraldehído (n=3) Paraformaldehído (n=5) | 5 días |
| III | 8 | Luteína i.t. | Sí | Glutaraldehído (n=4) Paraformaldehído (n=4) | 5 días |
| IV | 11 | Luteína t.t. para cuantificación | No | No | 30 min 1 hora 2 horas 5 días |
| V | 8 | Luteína i.t. + Cisplatino i.p. | Sí | Glutaraldehído (n=4) Paraformaldehído (n=4) | |

Tabla 2. Resumen de procedimientos experimentales, histológicos y eutanasia en cada grupo de estudio. DMSO:dimetilsulfóxido. I.t.: intratimpánica. I.p.:intraperitoneal.

3.2.2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS

Vía intraperitoneal

-Anestesia. La anestesia de las ratas Wistar se llevaba a cabo mediante el empleo de ketamina (Ketolar®, 1ml) y diazepam (Valium®, 1ml).

-Cisplatino (Pharma-Pfizer®). La dosis de cisplatino empleada fue de 10 mg/kg. La administración intraperitoneal del mismo se realizaba a través de una bomba de infusión.

Vía intratimpánica

-Luteína (Sigma-Aldrich®). Dado que no se encontraron estudios previos de utilización de luteína trastimpánica, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de la dosis de luteína empleada en animales de experimentación en otros aparatos y sistemas. Se eligió la dosis de 1 mg/ml, empleada en varios estudios oftalmológicos (Wang y cols., 2008; Xu y Lin, 2010).

La luteína viene dispensada en forma de granulado, por lo que para su administración intratimpánica era necesario realizar una disolución empleando como solvente DMSO al 0,5% en PBS (Sigma-Aldrich®). Cada vial contiene 1 mg de luteína. Para obtener una dilución de 1 mg/ml se añadía 1 ml del solvente dentro del envase. El envase se introducía a continuación en

un sonicador (aparato que utiliza ultrasonidos para agitar las partículas de una muestra) durante 3-5 minutos, para obtener su completa disolución.

3.2.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.2.3.1 ANESTESIA

Las ratas Wistar se anestesiaron con una dilución compuesta por la mezcla de 1 ml de ketamina (50mg/kg (1 ml) y 1 ml de diazepam (0.1 mg/kg). En animales del peso utilizado (200-250 g) se conseguía una anestesia adecuada con la inyección intraperitoneal de 1ml de esta mezcla. Durante el procedimiento experimental se administraban dosis añadidas de 0,5 ml en caso de que se detectaran signos de despertar o de sufrimiento del animal.

3.2.3.2 ESTUDIO FUNCIONAL

Tras obtener una adecuada anestesia del animal, se llevaba a cabo una exploración otoscópica de ambos oídos. Los animales con signos de otitis media presente o pasada eran descartados.

Se eligió un equipo de PEAee (Intelligent Hearing System Smart-EP, FL, USA) para la realización del estudio electrofisiológico. Este equipo permite explorar el espectro auditivo de la rata, que está situado en frecuencias más altas que el humano (Viberg y Canlon, 2004). En la ototoxicidad por cisplatino los PEAee nos permiten evaluar el descenso del umbral auditivo que presenta el animal de experimentación en cada frecuencia de estudio, y comparar la pérdida registrada en frecuencias agudas con la presente en frecuencias graves.

Los PEAee se realizan utilizando el sistema de doble cabina eléctricamente aislado, con registro de sonido en respuesta a 100 "*clicks*" por milisegundo (ms), o ráfagas tonales a 8, 12, 16, 20, 24 y 32 kHz con 10 ms de meseta y 1 ms de tiempo de subida/bajada. Las intensidades son registradas según el patrón anterior. El umbral de PEAee se define como la intensidad más baja capaz de provocar una respuesta visualmente detectable y repetible.

El equipo de PEAee empleado consta de tres elementos fundamentales: un sistema de cables y electrodos para el registro de los potenciales; un dispositivo de registro central conectado a un ordenador; y unas cánulas flexibles para la presentación de estímulos auditivos que ejercen la función de auriculares (Fig. 19).

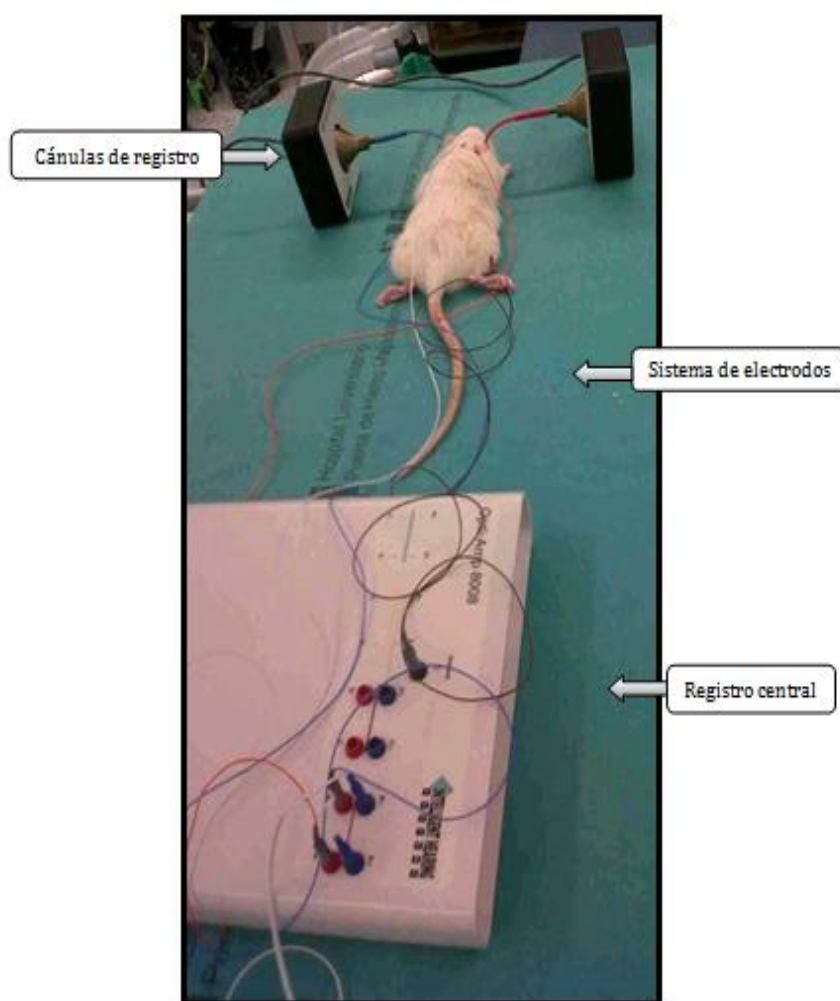


Figura 19. Visión del sistema de Potenciales Evocados Auditivos de estado estable (PEAee) (Intelligent Hearing System Smart-EP, FL, USA). Se evidencian los distintos componentes del mismo señalados mediante flechas (cánulas de registro, sistema de electrodos, y el aparato de registro central).

El estímulo sonoro llega al oído del animal a través de las cánulas flexibles (Etymotic ER-2) colocadas en el CAE. Existen dos cánulas diferenciadas para cada oído; la roja se coloca en el oído derecho y la azul en el oído izquierdo (Fig. 20). La respuesta cerebral tras la estimulación sonora es recogida a través de los electrodos de registro e interpretada por el ordenador central, generándose una gráfica que representa el nivel de audición medido en decibelios (dB) respecto a las frecuencias exploradas, medidas en kiloHercios (kHz). Los electrodos de registro se colocaban según una distribución determinada por cada fabricante. En este caso, se utilizan cuatro electrodos (rojo, azul, blanco y negro). Los electrodos rojo y azul se denominan electrodos activos, y se colocan en la proximidad de cada pabellón auricular. El electrodo blanco, electrodo de referencia, se coloca en el vértex; el negro, electrodo de tierra, en la región proximal de la extremidad inferior derecha, tal y como se muestra en la figura 20. Todos los electrodos se situaban con su extremo en el tejido celular subcutáneo con el fin de minimizar la interferencia en el registro de los artefactos generados por los órganos internos del animal.



Figura 20. Representación de la colocación de las cánulas de registro, así como de la disposición de los electrodos de los potenciales evocados auditivos de estado estable.

3.2.3.3 TÉCNICA DE INYECCIÓN INTRATIMPÁNICA

Las inyecciones intratimpánicas se llevaban a cabo bajo control microscópico (Leica®).

El material utilizado fue una jeringuilla de insulina (1 ml) y una aguja espinal de punta de lápiz BD Whitecare® de calibre 27 G y 127 mm de longitud. Con el fin facilitar la visión de la membrana timpánica durante la punción, se realizaba una angulación manual en el extremo más proximal de aproximadamente 30° con respecto al eje.

Con el animal en decúbito lateral, se traccionaba del pabellón auricular para rectificar el conducto y poder visualizar la membrana. Se localizaba la *pars flaccida* de la membrana timpánica y se efectuaba un pequeño orificio en la misma, con el fin de disminuir la estanqueidad de la caja del tímpano. A continuación, se realizaba una punción sobre la región inferior de la *pars tensa* de la membrana timpánica y se procedía a la inyección lenta de la sustancia a estudio hasta rellenar por completo la cavidad del oído medio. La cantidad de sustancia que rellena por completo la cavidad del oído medio en la rata Wistar es aproximadamente de 0,03 cc.

Es importante tener en cuenta la disposición espacial de los huesecillos de la caja del tímpano con el fin de no lesionarlos durante la realización de la punción trastimpánica. También es importante no profundizar en exceso a la hora de introducir la aguja a través de la membrana del tímpano, para no producir una lesión del oído interno.

Tras cada inyección intratimpánica el animal permanecía durante 30 minutos en decúbito lateral sobre el oído no tratado, para optimizar el tiempo de contacto entre la solución y la membrana de la ventana redonda y permitir la difusión de la sustancia inyectada al oído interno. Tras la inyección de suero salino en el oído contrario no se realizó esta maniobra, ya que servía para reproducir la posible pérdida de audición secundaria a la punción de la membrana timpánica.

3.2.3.4 TÉCNICA DE ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE CISPLATINO

Tras la administración trastimpánica de DMSO, DMSO más luteína o suero salino fisiológico en los grupos II y V, se realizaba la inyección intraperitoneal de cisplatino mediante bomba de infusión, a lo largo de un periodo total de 30 minutos.

La cantidad de cisplatino administrada a cada animal se calculaba según el peso del mismo, a dosis de 10mg/kg.

Estando el animal anestesiado, se coloca el cuerpo en decúbito supino y se realiza una palpación de las estructuras abdominales e inguinales. Bajo anestesia general se introduce la aguja de la palomilla de infusión de cisplatino en la porción más inferior y lateral de la cavidad abdominal. Dicha localización minimiza el riesgo de punción de vísceras huecas y permite una correcta difusión del fármaco a través del peritoneo. La aguja de punción está unida a una bomba de infusión (Hardward 11plus®), tal y como se muestra en la figura 21.

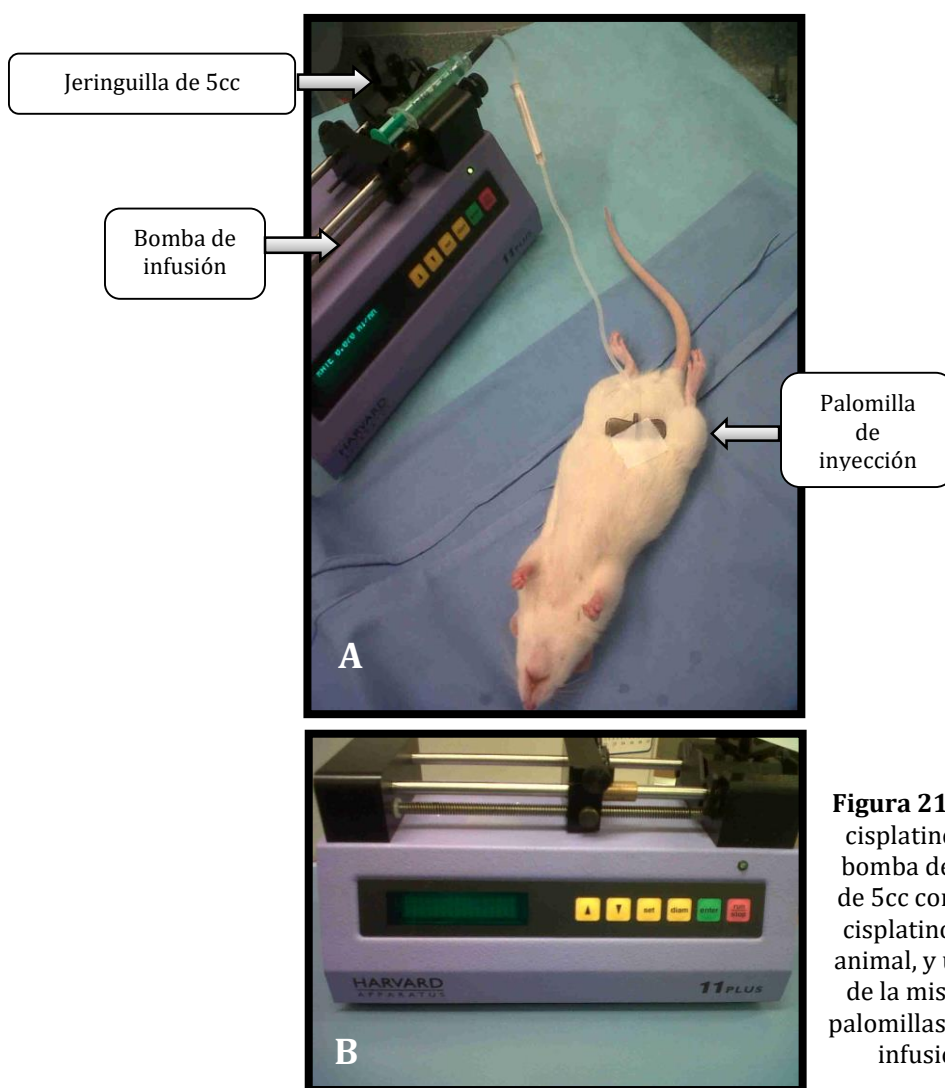


Figura 21. Sistema de infusión de cisplatino (A) compuesto por la bomba de infusión, la jeringuilla de 5cc con la dosis ponderada de cisplatino según el peso de cada animal, y un sistema de inyección de la misma mediante el uso de palomillas de inyección. Bomba de infusión de cisplatino (B).

Durante este proceso es importante comprobar que no se abulte la zona donde se introduce la aguja de infusión, dado que esto indica que la aguja se ha colocado en un plano subcutáneo y no en el interior de la cavidad peritoneal. Cuando esto sucede es preciso parar la infusión, recolocar la aguja y continuar el procedimiento.

3.2.3.5 CONTROL POSTOPERATORIO INMEDIATO

Tras la realización del tratamiento intratimpánico e intraperitoneal, el animal era trasladado a las habitaciones de estabulación del animalario del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda. Se aplicaba una fuente externa de aire caliente a cada jaula en el postoperatorio inmediato, con el fin de mantener una correcta temperatura corporal, disminuir el riesgo de insuficiencia renal y ayudar al despertar del animal.

3.2.3.6 EUTANASIA

El sacrificio de los animales se realizaba mediante sofocación por monóxido de carbono. Una vez comprobada la ausencia de vida en cada animal, se decapitaba y se procedía a la extracción y disección de los huesos temporales para su posterior descalcificación y análisis microscópico.

En el grupo IV los animales fueron sacrificados a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 5 días después de la administración intratimpánica de luteína (2 animales en cada subgrupo). En el resto de los grupos el sacrificio se realizó tras la finalización del segundo registro de PEAAe (tabla 2).

3.2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS

3.2.4.1 EXTRACCIÓN Y FIJACIÓN COCLEAR

La técnica de obtención de cócleas es similar a la utilizada en otros estudios (Roldán-Fidalgo, y cols., 2014). Brevemente, los huesos temporales extraídos se colocan sobre una placa de Petri® y sumergidos en PBS. Se localiza la porción coclear y, bajo visión microscópica, se independiza del resto del hueso temporal. Se extirpan los huesos yunque y martillo, se desarticula el hueso del estribo y se levanta la platina. Se identifica la ventana oval y la ventana redonda. Se punciona la membrana de la ventana redonda y se inyecta una solución fijadora a través de la misma, que recorre todas las espiras cocleares y sale de la cóclea por la ventana oval, consiguiéndose así una correcta fijación intracoclear.

Las piezas que iban a ser marcadas con inmunohistoquímica se perfundían con formol (que no tiene fluorescencia intrínseca, como el glutaraldehído), y las que iban a ser analizadas mediante óptica de Nomarski (sin tinción) se procesaban con glutaraldehído, que permite una

mejor fijación y visualización de los cilios. A continuación, todas las muestras se descalcificaban en ácido etilendiaminotetraacético al 1% (EDTA) a temperatura ambiente (con cambios diarios de líquido) durante 10-12 días.

3.2.4.2 MARCADO INMUNOHISTOQUÍMICO

Una vez que la muestra estaba completamente descalcificada, se colocaba sobre una placa de Petri® con suero fisiológico y se visualiza con la ayuda de un microscopio quirúrgico.

Con una hoja de bisturí, se realizaba un corte mediomodiolar, es decir, desde el ápex coclear hasta el margen lateral de la ventana redonda. Se obtenían así dos fragmentos cocleares de similar tamaño (hemicócleas), separados por el eje central o modiollo. Esta incisión ha de realizarse de forma limpia y en un solo movimiento, evitando el cizallamiento que dañaría el tejido coclear y alteraría el estudio microscópico posterior de las muestras.

Las hemicócleas se procesaban para marcado inmunohistoquímico de la actina (marcador de citoesqueleto, incluidos los cilios de las células ciliadas) y núcleos mediante el siguiente protocolo:

- ✓ Incubación con PBS durante 10 minutos.
- ✓ Añadidos posteriores, cada 10 minutos, de NHCL4 a 50mM y Tween al 0,1%.
- ✓ Se añade suero de albúmina bovina (BSA) al 5% durante media hora.
- ✓ Incubación con faloidina 488 (Sigma Aldrich Química S.A., Tres Cantos, España) 1/20 en BSA al 1% durante 3 horas.
- ✓ Seguidamente, tres lavados con PBS cada 5 minutos.
- ✓ A continuación, incubación con TO-PRO 1/500 (Invitrogen S.A., Prat de Llobregat, España) en PBS durante 20 minutos.
- ✓ Se realizan de nuevo 3 lavados con PBS cada 5 minutos y por último un lavado con agua destilada, y se monta la muestra.

Las muestras eran visualizadas en un microscopio láser confocal de barrido (MLCB) SP5 (Leyca Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.2.4.3 PREPARACIONES DE SUPERFICIE

Las hemicócleas marcadas con faloidina y TO-PRO eran conservadas a 4°C hasta su disección para la obtención de preparaciones de superficie, que tenía lugar habitualmente 24-48 horas después de finalizar el procesamiento inmunohistoquímico. Las hemicócleas que no precisaban tinción, fijadas con glutaraldehído, eran diseccionadas una vez completamente descalcificadas.

Cada hemicóclea posee un fragmento de las espiras media y basal de la cóclea, y en una de ellas se encuentra la espira apical. Se empleó una técnica de disección convencional en la que se trabajaba espira por espira, realizando incisiones en el hueso de la cápsula ótica, seguidas de su extirpación y la del ligamento espiral, así como la zona correspondiente al ganglio espiral (donde el tejido era mucho más grueso que en la región periférica). Cada fragmento de la disección contenía finalmente el limbo espiral, las células ciliadas y las células de soporte. La membrana tectoria también se extraía para facilitar la visualización de las estructuras ciliares.

Todos los fragmentos se colocaban sobre un portaobjetos identificando la localización de la espira basal, media y apical. Las muestras eran visualizadas con un microscopio confocal láser de barrido con un objetivo de 63x y posterior zoom óptico x3 de zonas seleccionadas en cada espira, para el conteo de estructuras celulares conservadas y dañadas en cada región de interés.

La presencia de daño coclear se manifiesta morfológicamente como ausencia de células ciliadas externas e internas (presencia de espacios vacíos entre las células), cuantificándose en cada espira coclear el porcentaje de desaparición de estructuras celulares en una área representativa de cada una de ellas. En las muestras marcadas con inmunohistoquímica se estudiaron los cambios morfológicos y la presencia de signos indirectos de apoptosis celular, como son la presencia de núcleos celulares en forma de semiluna o la condensación de cromatina con picnocitosis.

3.2.5 CUANTIFICACIÓN DE LA LUTEÍNA

En el grupo IV de estudio se realizó el sacrificio del animal a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 5 días tras la administración intratimpánica de luteína (2 animales en cada subgrupo).

Tras la extracción del hueso temporal y la disección de la porción coclear, se localizaba el ápex coclear y se realizaba un orificio en el mismo utilizando una aguja de insulina. Se introducía a su través la punta de una micropipeta Hamilton® de 50 microlitros y se extraía el líquido perilinfático lentamente utilizando una bomba de inyección con acción inversa (succión). El líquido coclear obtenido se introducía en un tubo Eppendorf y las muestras se conservaban en un congelador a -80°C hasta su análisis.

La detección de luteína en el líquido coclear se llevó a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentación y Nutrición (ICTAN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Para su determinación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Olmedilla-Alonso B y cols., 2014). Se trata de un sistema compuesto por una bomba, un inyector Rheodyne y un detector de fotodiodos modelo 2998 (Waters, Milford, MA, USA). Posee una columna Spheri-5-ODS (220 mm x 4.6 mm)

(BrownleeLabs, AppliedBiosystem, Santa Clara, CA, USA) y una precolumna (Aquapore ODS tipo RP-18). La fase móvil está compuesta por acetonitrilo-metanol (85/15) y estabilizada con acetato amónico (0.025M). El flujo de la fase móvil es de 1.8ml/min. La detección se realizó a 450 nm. Los cromatogramas se procesaron utilizando el software Empower 2 (Waters, Milford, MA, USA).

Debido a la muy escasa cantidad de líquido intracoclear extraído de cada cóclea de rata, para determinar la presencia de luteína es preciso realizar concentraciones de la muestra. Se añaden 30 µl de agua, 30 µl de etanol (EtOH) y 60 µl de hexano. La mezcla resultante se agita en un vórtex durante 1 minuto. A continuación se centrifuga el conjunto durante 5 min a 3500 rpm. Se recoge el sobrenadante y se deseca en atmósfera de nitrógeno. Se reconstituye con 25 µl de EtOH: tetrahidrofurano (THF) (2:1). Se agita la mezcla utilizando ultrasonidos y se inyecta todo el volumen (hasta 25 µl) en el HPLC.

La preparación de la solución patrón de luteína (Sigma Chemical Co®, St. Louis, MO, USA) se realiza a partir de 1 mg de luteína y se disuelve en 25 ml de THF con 0.01 de BHT (butilhidroxitolueno). Las soluciones de trabajo se obtuvieron mediante diluciones de la solución madre en THF: EtOH (1:2 v/v). La concentración de luteína en la curva utilizada es de 0.27–1.36 µg ml⁻¹ ($R^2 = 0.999$). El límite de detección de la luteína en el sistema anteriormente descrito es de 0.35 ng en 5 µl inyectados (69 ng luteína /ml).

3.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo en la Unidad de Apoyo Metodológico y Estadístico del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Puerta de Hierro.

Con el fin de evaluar el potencial efecto ototóxico de la luteína y del DMSO administrados de forma aislada o en combinación con cisplatino, se realizó un análisis factorial y ANOVA utilizando el software SPSS.

Se comparan los resultados tanto funcionales como histológicos obtenidos entre el oído derecho (DMSO ó DMSO+luteína) y el oído izquierdo (suero salino fisiológico) de cada animal, así como entre los animales que recibieron tratamiento con o sin cisplatino. Para ello se realizaron análisis pareados entre cada oído del animal y entre los distintos tratamientos administrados, con el fin de identificar variaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los distintos grupos.

3.3 REVISIÓN DE LA LITERATURA

Se llevó a cabo una revisión narrativa de todos los artículos publicados hasta mayo de 2014 en relación con el estudio de la ototoxicidad inducida por cisplatino en modelos animales mamíferos. Se extrajeron datos sobre el tipo de animal empleado, las características de la población estudiada, el tratamiento utilizado y los resultados histológicos y funcionales que se obtuvieron en cada estudio. Con ello se pretende dar una visión global de los resultados alcanzados por las distintas sustancias potencialmente otoprotectoras testadas en modelos animales frente a la ototoxicidad por cisplatino, y compararlos con los alcanzados por la luteína en el presente estudio experimental.

3.3.1 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se llevó a cabo una búsqueda en Medline a través de PubMed (desde 1966 hasta la actualidad). Se usaron los siguientes términos MeSH y texto libre:

1. Para cisplatino:

Cisplatin OR cis-Diamminedichloroplatinum(II) OR Platinum Diamminodichloride OR Diamminodichloride, Platinum OR cis-Platinum OR cis Platinum OR Dichlorodiammineplatinum OR cis-Diamminedichloroplatinum OR cis Diamminedichloroplatinum OR cis-Dichlorodiammineplatinum(II) OR Platinol OR Platidiam OR Platino OR NSC-119875 OR Biocisplatinum OR CDDP OR CACP OR cisplatin* OR abiplatin OR neoplatin OR cis-DDP

2. Para hipoacusia:

Deafness OR hearing loss OR Loss, Hearing OR hearing disorder OR hearing disorders OR auditory OR hearing impairment OR hearing impairments OR hearing impairment* OR hear* OR audiology OR audiologic OR audiometry OR audiometr* OR audiogram OR audiography OR ototoxicology OR ototoxic* OR hypoacusis OR hypoacuses OR hypoacus* OR ototoxicity OR deaf* OR cochleotoxicity

3. Para mamíferos:

(Animals NOT humans) AND Mammals OR mammal

4. Para modelos experimentales:

Animal Model OR Animal Models OR Model, Animal OR Laboratory Animal Models OR Animal Model, Laboratory OR Animal Models, Laboratory OR Laboratory Animal Model OR Model, Laboratory Animal OR Models, Laboratory Animal OR Experimental Animal Models OR Animal Model, Experimental OR Animal Models, Experimental OR Experimental Animal Model OR Model, Experimental Animal OR Models, Experimental Animal

3.3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Una vez recopilados todos los artículos que incluyen los términos MeSH previamente mencionados, se seleccionaron aquellos en los que se evaluaba el potencial efecto de diferentes sustancias frente a la ototoxicidad por cisplatino en modelos de experimentación animal en mamíferos. Los estudios que emplean un quimioterápico diferente al cisplatino, los ensayos clínicos, los artículos en otros idiomas diferentes al inglés, español y francés, y aquellos en los que la evaluación fue realizada exclusivamente en cultivos celulares o animales no mamíferos como el pez cebra, fueron descartados.

Se leyó con detenimiento el texto completo de los artículos seleccionados y se recogieron los datos sobre los agentes protectores empleados, la dosis de cisplatino, las diferentes vías de administración, el modelo animal utilizado, la técnica utilizada para medir la pérdida de la audición, el tiempo de seguimiento, y los resultados histológicos y funcionales alcanzados.

Se han considerado resultados funcionales o morfológicos positivos en cada estudio analizado cuando se producía una preservación estadísticamente significativa de la audición o de las estructuras celulares del oído interno, según la metodología de cada trabajo.

4. RESULTADOS

4.1 CULTIVOS CELULARES

Para evaluar el efecto de la luteína y del cisplatino en la línea celular HEI-OC1, las células fueron expuestas durante 24 horas a ambas sustancias por separado. Los cultivos celulares tratados con luteína no mostraron datos significativos de daño celular, pero sí un claro efecto dependiente de la dosis (Fig. 22A). La administración de luteína a bajas concentraciones no afectó a la viabilidad celular, pero el empleo de concentraciones superiores a 80 μM produjo una disminución significativa del número de células vivas.

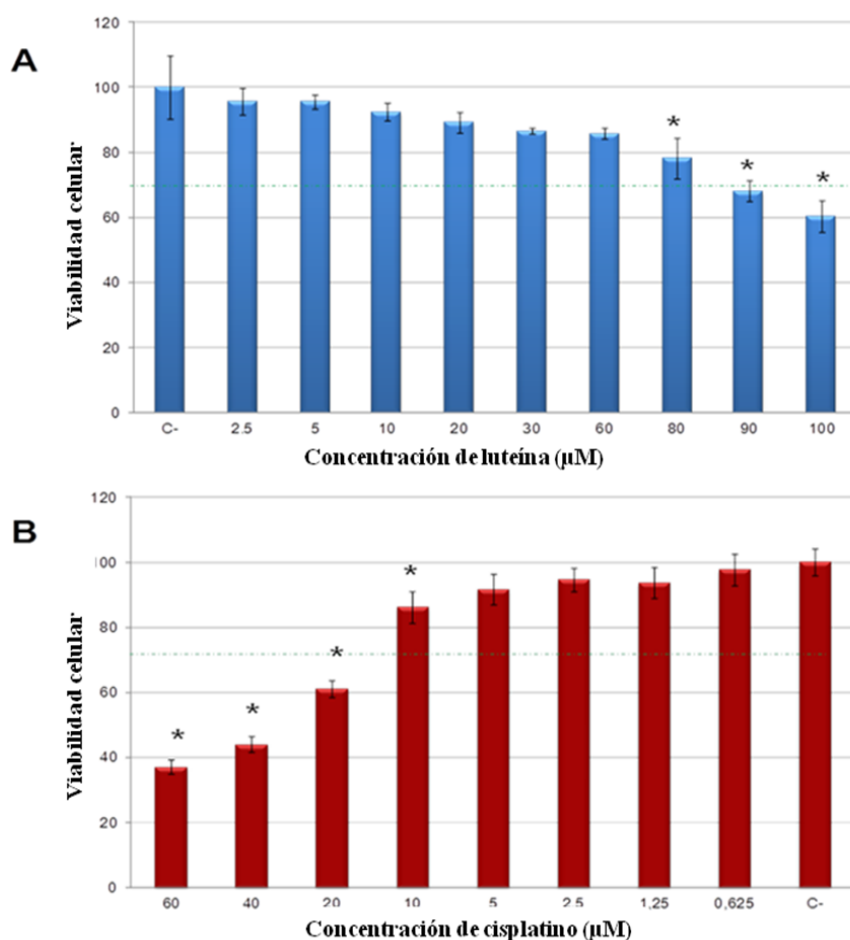


Figura 22. Efecto de la luteína y cisplatino en las células HEI-OC1 a las 24 horas. (A) HEI-OC1 tratadas con luteína. (B) HEI-OC1 tratadas con cisplatino. Se representa la media y desviación estándar de la viabilidad celular, comparándolas con un grupo control (C-).

La línea celular HEI-OC1 tratada con cisplatino mostró signos estadísticamente significativos de daño celular (Fig. 22B). A nivel histológico se evidenciaron cambios proapoptóticos en los núcleos celulares tras la tinción con Hoechst 33258. La disminución de la viabilidad celular fue también dependiente de la dosis. Las concentraciones de 20 μM a 100 μM

se consideraron citotóxicas ya que disminuyeron la viabilidad celular en más del 70%. Se estimó finalmente que la concentración que inhibía el 50% de las células (IC50) después de 24 horas en DMEM correspondía a 25 μ M y fue elegida como la concentración adecuada para valorar el efecto protector de la luteína frente a la ototoxicidad por cisplatino.

Veinticuatro horas después de la administración de cisplatino a los cultivos celulares tratados con luteína a concentraciones de 80 y 60 μ M, se observó una reducción significativa de la citotoxicidad inducida por cisplatino (Fig. 23A). Estas concentraciones aumentaron la viabilidad celular de un 55% a un 80%. Concentraciones más altas, de 100 μ M, alcanzaron niveles de protección celular. Las inferiores a 60 μ M no pudieron frenar el efecto nocivo del cisplatino sobre los cultivos celulares.

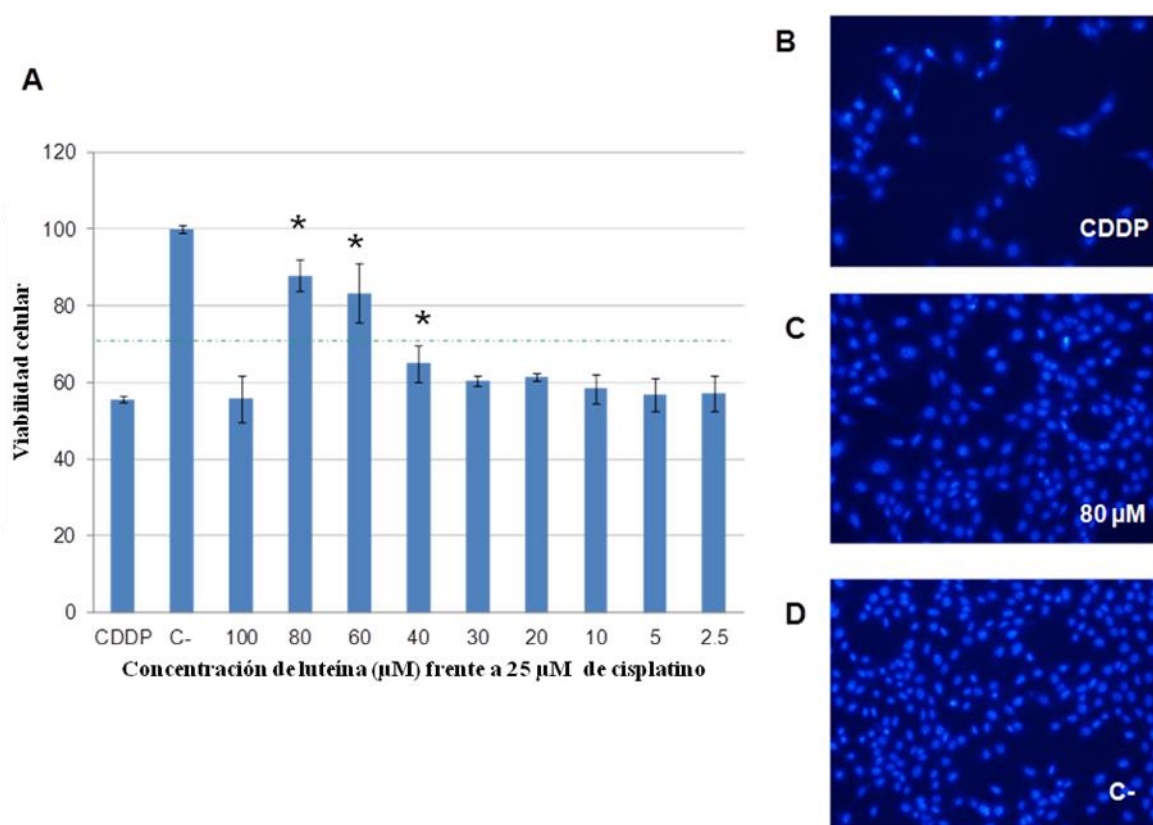


Figura 23. Correlación entre la concentración de luteína y cisplatino y su afectación histológica. (A) Efecto del tratamiento con luteína y cisplatino 25 μ M. A la derecha micrografías de fluorescencia de células HEI-OC1 en cultivo teñidas con Hoechst 33258 tras el tratamiento con 25 μ M cisplatino (B), 80 μ M luteína y cisplatino 25 μ M (C) y 0,5% de DMSO en PBS como control de viabilidad (D). Se representa la media y la desviación estándar de la viabilidad celular comparándolas con un grupo control (C-).

El análisis histológico se muestra en la figura 23 (B, C y D). Se puede observar la disminución de la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino (B), así como la similitud entre el grupo control (D) y las células tratadas con luteína a 80 μ M (C).

4.2 ESTUDIO IN VIVO

4.2.1 GRUPOS CONTROL CON ADMINISTRACIÓN DE DMSO (I y II)

Ningún animal presentó signos de otitis media en la exploración otoscópica, por lo que no se tuvieron que descartar animales por este motivo. Un animal del grupo II falleció a los 5 días de recibir tratamiento con cisplatino a consecuencia de la toxicidad sistémica producida por el mismo.

4.2.1.1 RESULTADOS FUNCIONALES

Grupo I (DMSO)

No se observaron variaciones de audición estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ninguna frecuencia de estudio, en ninguno de los dos oídos tratados. La variación auditiva detectada tras la inyección trastimpánica de DMSO fue de 2 a 10dB.

En la figura 24 se recogen de manera conjunta los datos de ambos oídos. En la tabla 3 se representan las variaciones de audición por frecuencias en ambos oídos por separado.

La presencia de variaciones no significativas de los niveles de audición hace pensar que la administración trastimpánica de DMSO no genera una lesión celular del oído interno, aún empleándose concentraciones elevadas del mismo (DMSO 1%).

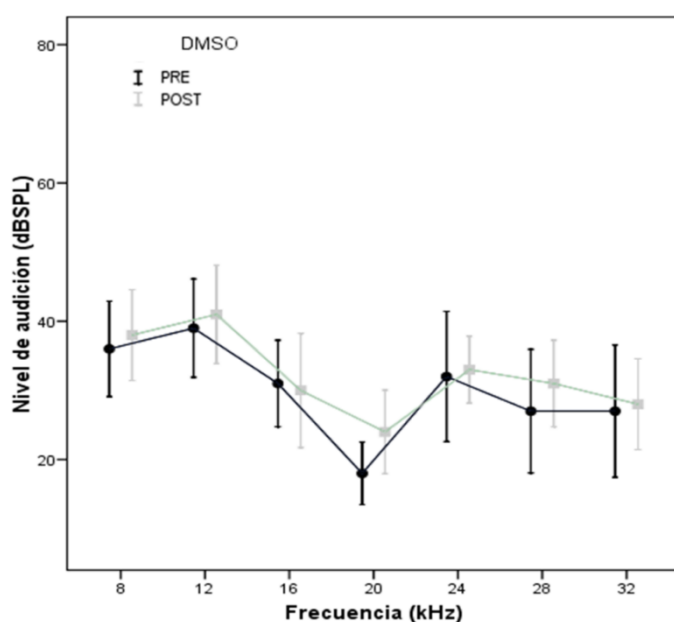


Figura 24. Variación de la audición tras la administración de DMSO (1%). Se representa la media y la desviación estándar de la audición de los animales en cada frecuencia. La línea negra refleja la audición pretratamiento (PRE) y la línea gris la audición postratamiento (POST).

| DMSO (1%) | kHz | Media | Desviación típica | IC 95% | | Significación estadística |
|-----------|-----|-------|-------------------|----------|----------|---------------------------|
| | | | | Inferior | Superior | |
| OD | 8 | -2 | 13 | -18,2 | 14,2 | 0,749 |
| | 12 | 0 | 10 | -12,4 | 12,4 | 1,000 |
| | 16 | -3 | 6,7 | -11,3 | 5,3 | 0,374 |
| | 20 | -10 | 14,1 | -32,5 | 12,5 | 0,252 |
| | 24 | -5 | 10 | -17,4 | 7,4 | 0,326 |
| | 28 | -5 | 20,6 | -30,6 | 20,6 | 0,616 |
| | 32 | 2 | 14,8 | -16,4 | 20,4 | 0,778 |
| OI | 8 | -2 | 16,4 | -22,4 | 18,4 | 0,799 |
| | 12 | -4 | 5,5 | -10,8 | 2,8 | 0,178 |
| | 16 | 4 | 18,2 | -18,6 | 26,6 | 0,648 |
| | 20 | 2 | 14,2 | -12,4 | 20,3 | 0,738 |
| | 24 | 2 | 11,0 | -11,6 | 15,6 | 0,704 |
| | 28 | -6 | 5,5 | -12,8 | 0,8 | 0,70 |
| | 32 | -8 | 11,5 | -22,3 | 6,3 | 0,195 |

Tabla 3. Variación auditiva tras la administración de DMSO (1%). Se representa la media, desviación típica, intervalo de confianza (IC-95%) y el grado de significación estadística de la variación de la audición en cada frecuencia.

Grupo II (DMSO +cisplatino)

En el grupo II, los resultados obtenidos en el oído derecho (tratado con DMSO) se compararon con los obtenidos en el oído izquierdo (tratado con suero salino fisiológico).

Se realizó un estudio preliminar de los niveles de audición del oído derecho y del oído izquierdo antes del tratamiento, sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas.

Tras el tratamiento con cisplatino los animales presentaron un empeoramiento auditivo pantonal, más acentuado en frecuencias agudas (por encima de 16kHz). Al comparar la pérdida de audición en frecuencias agudas con el presentado en frecuencias graves no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 25 se representan las variaciones de audición en cada frecuencia y en cada oído por separado. En la gráfica se observa que la variación en la audición del oído derecho (DMSO) es menor que la presentada en el oído izquierdo (suero salino fisiológico); sin embargo el análisis de esta diferencia no alcanzó la significación estadística. Este hecho demuestra que la administración de DMSO no tiene un efecto potenciador de la toxicidad por cisplatino, pero tampoco posee un efecto protector frente a su acción sobre el oído interno.

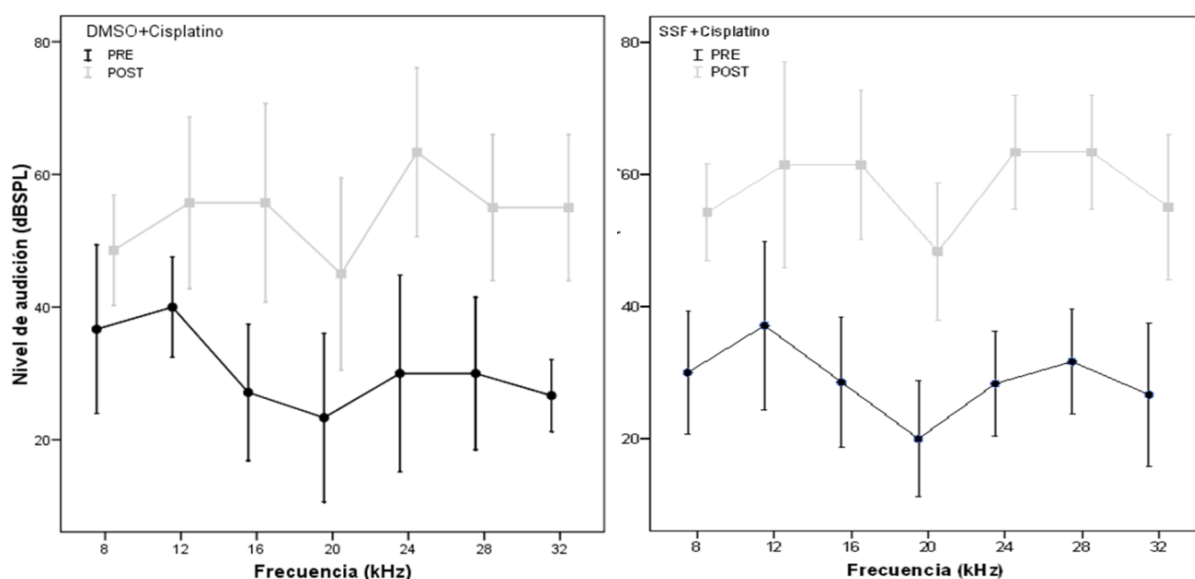


Figura 25. Variación de la audición tras la administración de DMSO (1%) y cisplatino. Se representa la media y la desviación estándar de la audición de los animales en cada frecuencia. La línea negra refleja la audición pretratamiento (PRE) y la línea gris la audición postratamiento (POST).

| DMSO (0,5%) + Cisplatino | Hz | Media | Desviación típica | IC 95% | | Significación estadística |
|-----------------------------|----|-------|----------------------|----------|----------|------------------------------|
| | | | | Inferior | Superior | |
| OD (DMSO) | 8 | -11,4 | 6,9 | -17,8 | -5,0 | 0,05 |
| | 12 | -15,7 | 11,3 | -26,2 | -5,2 | 0,10 |
| | 16 | -30,0 | 15,3 | -44,1 | -15,9 | 0,02 |
| | 20 | -21,7 | 14,7 | -37,1 | -6,2 | 0,15 |
| | 24 | -33,3 | 10,3 | -44,2 | -22,5 | 0,01 |
| | 28 | -25,0 | 10,5 | -36,0 | -14,0 | 0,02 |
| | 32 | -25,8 | 7,4 | -33,6 | -18,1 | 0,00 |
| OI (SSF) | 8 | -24,3 | 12,7 | -36,1 | -12,5 | 0,02 |
| | 12 | -25,0 | 21,0 | -44,4 | -5,6 | 0,20 |
| | 16 | -32,9 | 13,8 | -45,6 | -20,1 | 0,01 |
| | 20 | -28,3 | 7,5 | -36,2 | -20,4 | 0,00 |
| | 24 | -35,0 | 8,4 | -43,8 | -26,2 | 0,00 |
| | 28 | -28,3 | 7,5 | -36,2 | -20,4 | 0,00 |
| | 32 | -28,3 | 11,7 | -40,6 | -16,1 | 0,02 |

Tabla 4. Variación auditiva tras la administración de DMSO (0.5%) y cisplatino. Se representa la media, desviación típica, intervalo de confianza (IC-95%) y el grado de significación estadística de la variación de la audición en cada frecuencia. En negrita se muestran los resultados que alcanzaron una significación estadística ($p < 0.05$).

4.2.1.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

En el estudio histológico se evaluó la organización celular, la presencia de signos de apoptosis y el porcentaje de pérdida de células ciliadas internas y externas.

Grupo I (DMSO)

El estudio morfológico de las hemicócleas de las ratas Wistar tratadas con DMSO evidenció una preservación completa tanto de las células ciliadas externas (CCE) como de las células ciliadas internas (CCI) en todas las secciones cocleares (Fig. 26). No se detectaron signos de apoptosis ni de desorganización celular en ninguna de las espiras estudiadas. Esta integridad celular estuvo presente también en el oído tratado con suero salino fisiológico (control).

La ausencia de desorganización celular y de signos de apoptosis en las células tratadas con DMSO apoya el hecho de que su aplicación trastimpánica no es lesiva para el oído interno.

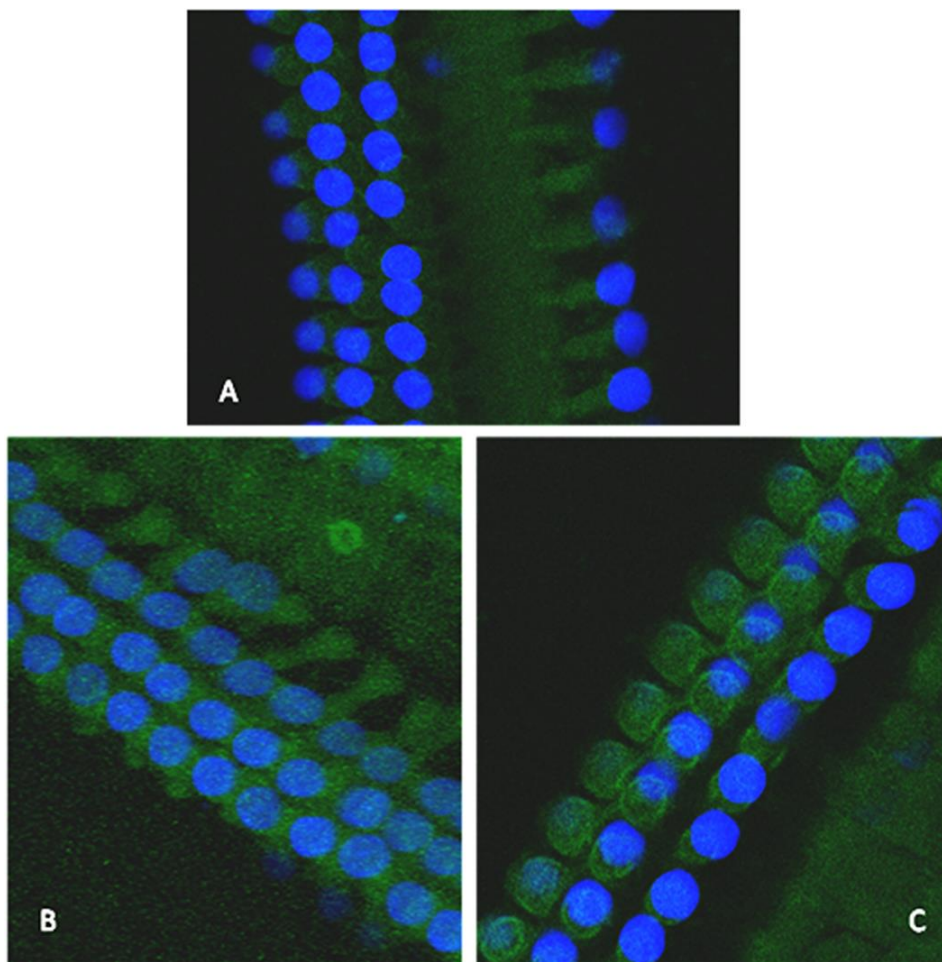


Figura 26. Microfotografías (MCLB) de la espira media (A, B) y basal (C) de una hemicoclea de rata Wistar tratada con DMSO. En el corte C se aprecia la V ciliar de las células ciliadas externas más laterales. Marcado con faloidina y TO-PRO (x180).

Grupo II (DMSO+cisplatino)

En las muestras cocleares de las ratas Wistar tratadas con cisplatino se observó una desestructuración de las filas celulares (Fig. 27), una pérdida de células ciliadas externas, y la presencia de signos de apoptosis. En ninguna muestra coclear se detectó pérdida de células ciliadas internas.

En la figura 27 se puede comparar la morfología y disposición celular de un oído derecho (tratado con DMSO) y la de un oído izquierdo (tratado con suero salino fisiológico) tras el tratamiento con cisplatino intraperitoneal. La desorganización de las tres filas de células ciliadas externas parece más evidente en la muestra coclear del oído izquierdo (tratado con suero salino fisiológico).

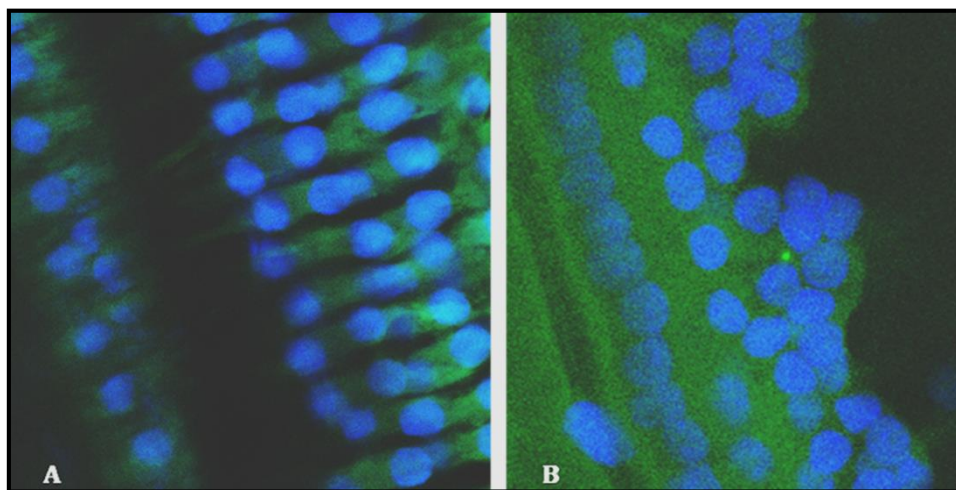


Figura 27. Microfotografías (MCLB) de espira media de rata Wistar tratadas con DMSO y suero fisiológico junto a cisplatino. (A) Oído derecho (tratado con DMSO), (B) Oído izquierdo (tratado con suero salino fisiológico). Se aprecia la desestructuración de las células ciliadas, más evidente en el oído izquierdo. Marcado con faloidina y TO-PRO (x180).

Los principales signos de apoptosis encontrados fueron: condensación de cromatina nuclear, picnosis y fragmentación del núcleo celular (Fig. 28).

El porcentaje de pérdida de células ciliadas externas en las muestras cocleares del oído derecho fue de un 15%, y en el del oído izquierdo de un 17%. Estas diferencias entre ambos oídos no fueron estadísticamente significativas, lo que sugiere que el DMSO no producía una potenciación de la toxicidad del cisplatino.

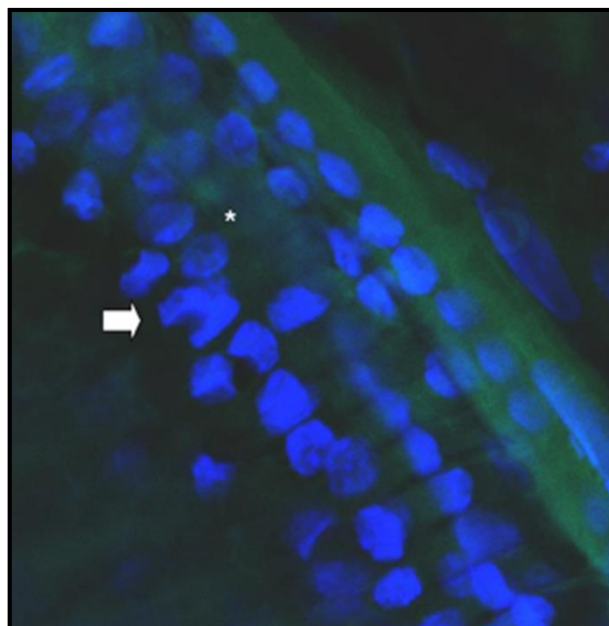


Figura 28. Microfotografías (MCLB) de una espira basal de oído derecho tratado con DMSO y cisplatino. La flecha blanca señala un núcleo en forma de semiluna y la presencia de condensación de cromatina con picnocitosis. El asterisco marca una zona de ausencia de células ciliadas externas. Marcado con faloidina y TO-PRO (x180).

4.2.2 GRUPOS CONTROL Y DE ESTUDIO CON ADMINISTRACIÓN DE LUTEINA

No se encontró ningún animal con signos de otitis media presente o pasada, por lo que no se tuvieron que descartar animales por este motivo. Al igual que en el grupo II, uno de los animales del grupo IV falleció a los 5 días de la inyección intraperitoneal como consecuencia de la toxicidad del cisplatino.

4.2.2.1 RESULTADOS FUNCIONALES

Grupo III (Luteína intratimpánica)

Se analizó la variación de la audición en cada frecuencia, evaluándose el grado de significación estadística del empeoramiento auditivo. Los resultados obtenidos en cada oído se analizaron por separado (Tabla 5) y se representan en la figura 29.

No se observaron variaciones de audición estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en ninguna frecuencia de estudio, ni tras la administración de luteína ni de suero salino fisiológico. La variación auditiva detectada tras la inyección trastimpánica de luteína fue de 3,3 a 10 dB, mientras que de suero salino fisiológico fue de 1,7 a 6,7 dB.

| Luteína | Hz | Media | Desviación típica | IC 95% | | Significación estadística |
|-------------------------------|----|-------|----------------------|----------|----------|------------------------------|
| | | | | Inferior | Superior | |
| OD (Luteína) | 8 | -10 | 12,6 | -23,3 | 3,3 | 0,111 |
| | 12 | -10 | 12,6 | -23,3 | 3,3 | 0,111 |
| | 16 | -3,3 | 5,2 | -8,8 | 2,1 | 0,175 |
| | 20 | -5 | 5,5 | -10,7 | 0,7 | 0,76 |
| | 24 | -6,7 | 10,3 | -17,5 | 4,2 | 0,175 |
| | 28 | -3,3 | 12,1 | -16 | 9,4 | 0,53 |
| | 32 | -5 | 5,5 | -10,7 | 0,7 | 0,76 |
| OI (SSF) | 8 | -6,7 | 8,2 | -15,2 | 1,9 | 0,102 |
| | 12 | -1,7 | 7,5 | -9,6 | 6,2 | 0,611 |
| | 16 | -3,3 | 5,2 | -7,8 | 4,5 | 0,696 |
| | 20 | -5,0 | 5,5 | -10,7 | 0,7 | 0,76 |
| | 24 | 3,3 | 5,2 | -2,1 | 8,8 | 0,175 |
| | 28 | 1,7 | 7,5 | -6,2 | 9,6 | 0,611 |
| | 32 | 1,7 | 9,8 | -8,7 | 12,0 | 0,695 |

Tabla 5. Variación auditiva tras la administración de luteína y suero salino fisiológico (SSF). Se representa la media, desviación típica, intervalo de confianza (IC-95%) y el grado de significación estadística de la variación de la audición en cada frecuencia.

Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos en el oído derecho con los del oído izquierdo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ni al comienzo del experimento ni tras el tratamiento. Este hecho sugiere que la administración trastimpánica de luteína no es perjudicial para el oído interno.

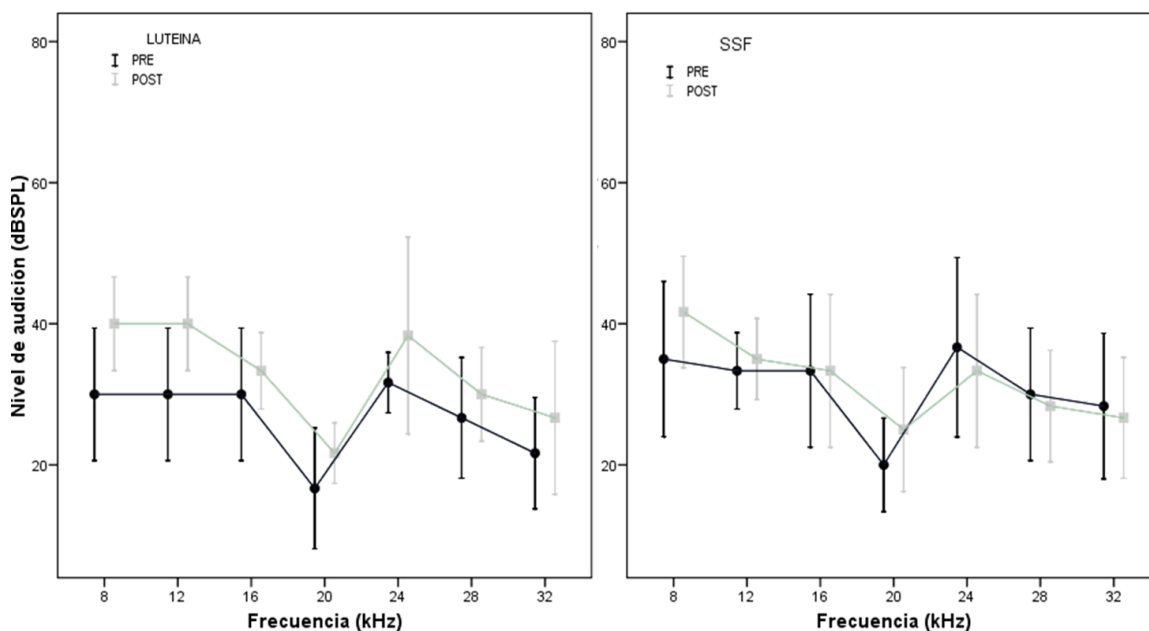


Figura 29. Variación de la audición tras la administración de luteína en oído derecho y suero salino fisiológico (SSF) en oído izquierdo. Se representa la media y la desviación estándar de la audición de los animales en cada frecuencia. La línea negra refleja la audición pretratamiento (PRE) y la línea gris la audición postratamiento (POST).

Grupo IV (Luteína + cisplatino)

Una vez descartado el efecto nocivo de la administración trastimpánica de luteína, se valoró su papel en la otoprotección frente a cisplatino. Para ello se compararon los resultados obtenidos en el estudio de PEAee en el oído derecho (tratado con luteína) con los del oído izquierdo (control). Las variaciones de audición en cada frecuencia fueron analizadas en cada oído por separado (Tabla 6) y se representan en la figura 30.

Tras el tratamiento con cisplatino los animales de estudio presentaron un empeoramiento auditivo estadísticamente significativo en todas las frecuencias salvo en 20 kHz en el oído derecho y en 32 kHz en el oído izquierdo. Los umbrales de audición de ambos grupos fueron comparados antes y después del tratamiento sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas.

| Luteína + Cisplatino | Hz | Media | Desviación típica | IC 95% | | Significación estadística |
|-------------------------------|----|-------|----------------------|----------|----------|------------------------------|
| | | | | Inferior | Superior | |
| OD (Luteína) | 8 | -11,7 | 9,8 | -22 | -1,3 | 0,034 |
| | 12 | -21,7 | 9,8 | -32 | -11,3 | 0,003 |
| | 16 | -18,3 | 9,8 | -28,7 | -8 | 0,006 |
| | 20 | -20 | 14,1 | -34,8 | -5,2 | 0,18 |
| | 24 | -33,3 | 8,2 | -41,9 | -24,8 | 0,000 |
| | 28 | -31,7 | 4,1 | -36 | -27,4 | 0,000 |
| | 32 | -31,7 | 11,7 | -43,9 | -19,4 | 0,001 |
| OI (SSF) | 8 | -18,3 | 7,5 | -26,2 | -10,4 | 0,02 |
| | 12 | -26,7 | 8,2 | -35,2 | -18,1 | 0,00 |
| | 16 | -30 | 14,1 | -44,8 | -15,2 | 0,03 |
| | 20 | -31,7 | 14,7 | -47,1 | -16,2 | 0,03 |
| | 24 | -36,7 | 12,1 | -49,4 | -24 | 0,01 |
| | 28 | -33,3 | 8,2 | -41,9 | -24,8 | 0,00 |
| | 32 | -25,0 | 15,2 | -40,9 | -9,1 | 0,10 |

Tabla 6. Variación auditiva tras la administración de luteína y suero salino fisiológico (SSF) junto a cisplatino. Se representa la media, desviación típica, intervalo de confianza (IC-95%) y el grado de significación estadística de la variación de la audición en cada frecuencia. En negrita se muestran los resultados que alcanzaron una significación estadística ($p < 0.05$).

Aunque parece existir un empeoramiento auditivo más acentuado en el oído tratado con suero salino fisiológico, no se encontraron diferencias significativas entre ambos oídos. Tampoco al comparar el empeoramiento auditivo en frecuencias graves con el presentado en frecuencias agudas.

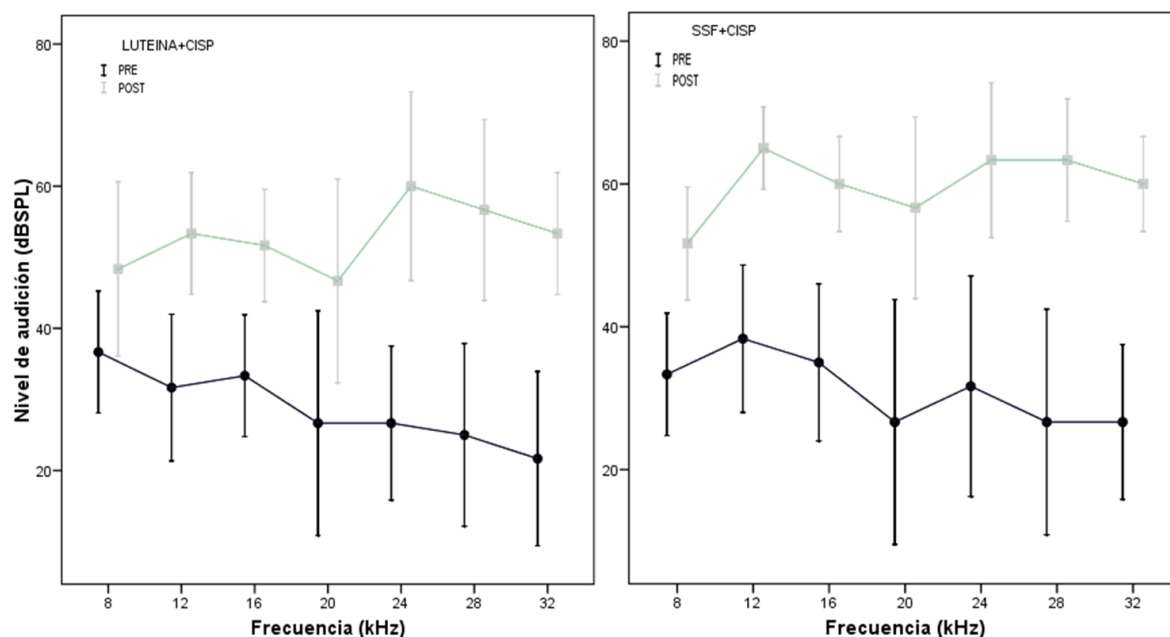


Figura 30. Variación de la audición tras la administración de luteína y suero salino fisiológico junto a cisplatino. Se representa la media y la desviación estándar de la audición de los animales en cada frecuencia. La línea negra refleja la audición pretratamiento (PRE) y la línea gris la audición postratamiento (POST).

4.2.2.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

En el estudio de las muestras cocleares se evaluó la ausencia de células ciliadas externas o internas, el porcentaje de pérdida celular, la organización celular, la integridad de la "V" ciliar de las células ciliadas y la aparición de signos de apoptosis.

Grupo III (Luteína)

En el estudio morfológico de las secciones cocleares obtenidas en las ratas Wistar tratadas con luteína, se observó una ausencia de lesión tanto de células ciliadas externas (CCE) como de células ciliadas internas (CCI) en todas las secciones cocleares (Fig. 31).

Esta integridad celular se evidenció también en el oído control (oído izquierdo), que recibió tratamiento con suero salino fisiológico.

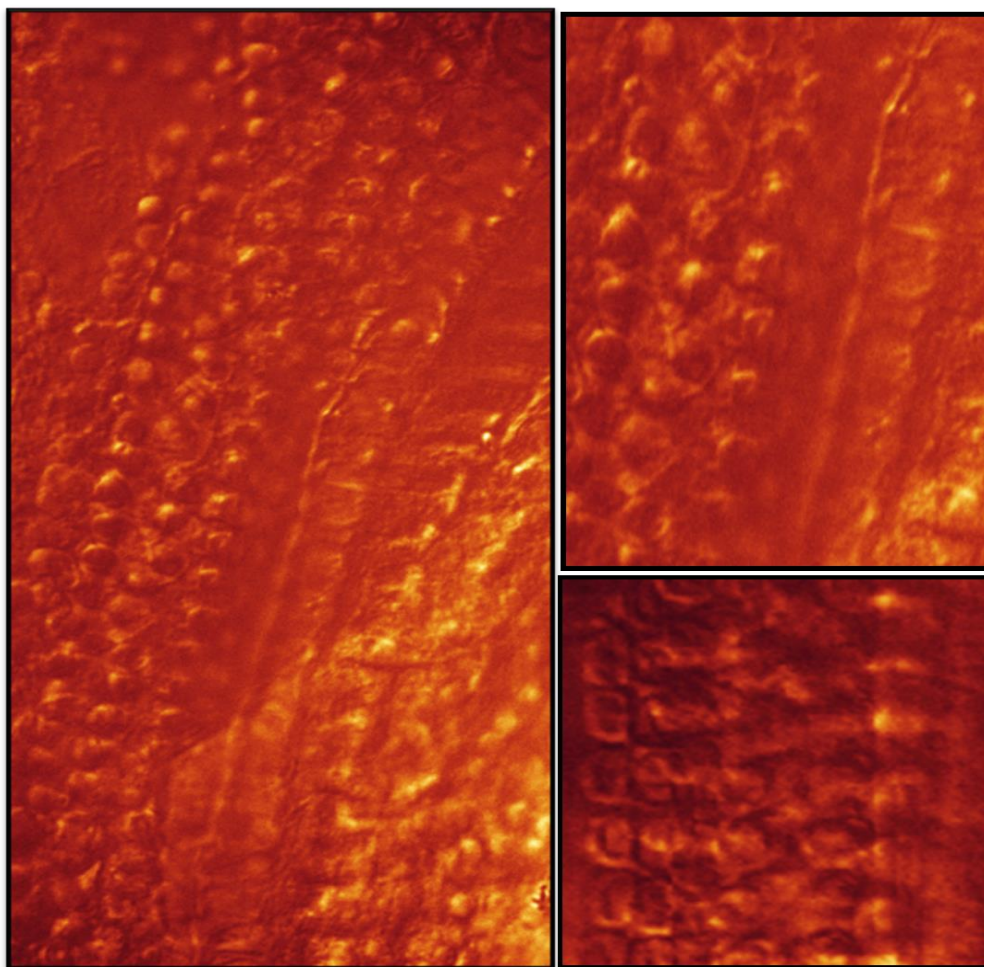


Figura 31. Microfotografías (MCLB) de la espira media de un oído derecho de rata Wistar tratada con lutéina trastimpánica, utilizando la técnica de Nomarski. Se puede observar una ampliación secuencial de la integridad de las tres filas de células ciliadas externas y de la fila de células ciliadas internas (x 63 en imagen de la izquierda y x180 en imágenes de la derecha).

No se detectaron signos de apoptosis ni de desorganización celular en ninguna de las espiras estudiadas. Tanto en la tinción con TO-PRO (Fig. 32A,B) como en la exploración microscópica de Nomarski (Fig. 33) se puede observar la preservación de la “V” ciliar de las células ciliadas externas.

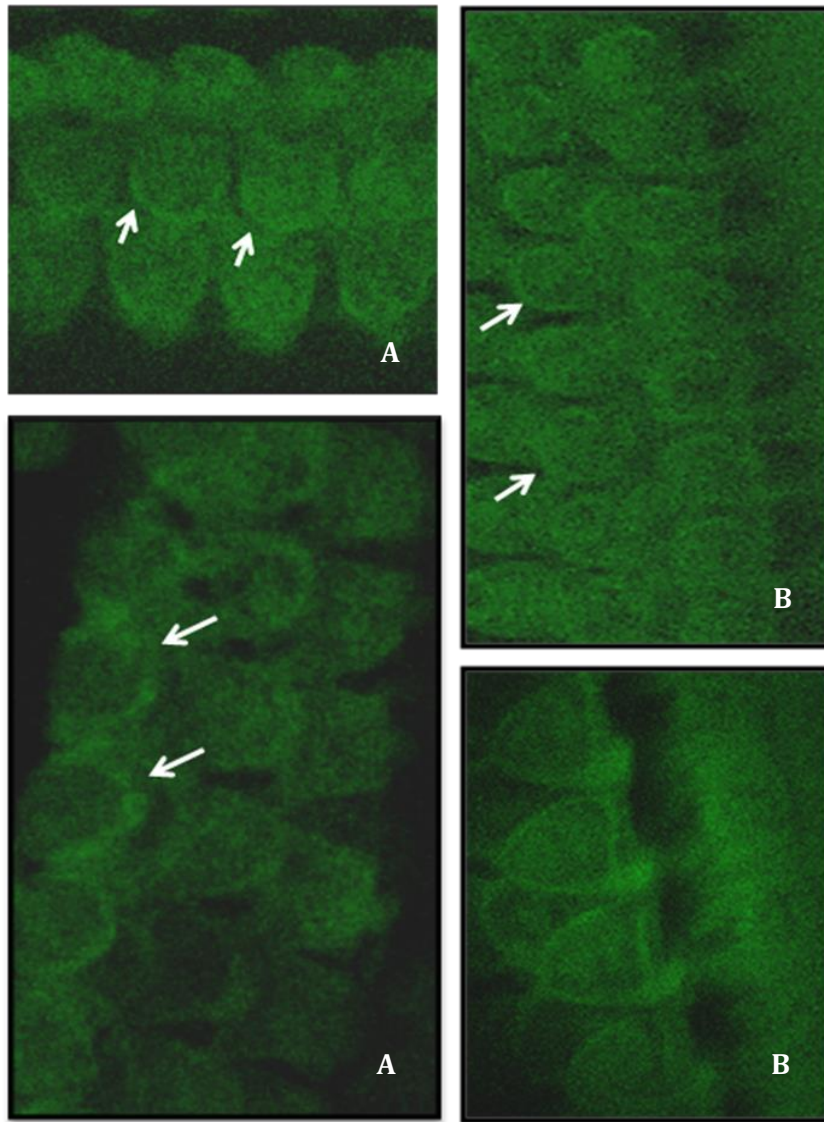


Figura 32. Microfotografías (MCLB) de espira apical (A) y media (B) de rata Wistar tratado con suero salino fisiológico (A) y luteína (B). Se puede observar la integridad de las 3 filas de células ciliadas externas, así como la preservación de la "V" ciliar. Las flechas blancas marcan los cilios de las células ciliadas externas. Marcado con faloidina (x180).

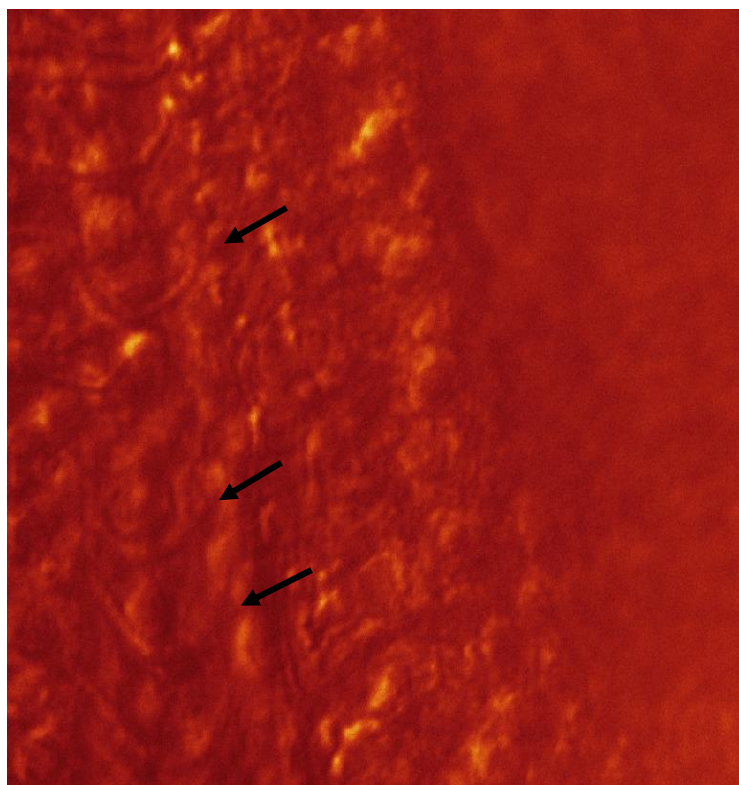


Figura 33. Microfotografías (MCLB) de espira basal de oído izquierdo utilizando la técnica de Nomarski. Se aprecian las estructuras en "V" de las células ciliadas externas (x180)

Grupo V (Luteína+cisplatino)

En las muestras cocleares de las ratas Wistar tratadas con cisplatino se evidenció una pérdida de células ciliadas externas, una desestructuración de las filas celulares, (Fig. 34), una ausencia de "V" ciliar y presencia de signos de apoptosis.

La ausencia de células ciliadas fue mayor en la espira basal de la cóclea, sin encontrarse diferencias significativas entre la pérdida celular del oído tratado con luteína frente al tratado con suero salino fisiológico.

Al igual que en el grupo de DMSO, los principales signos de apoptosis encontrados fueron: condensación de cromatina nuclear, picnosis y fragmentación del núcleo celular de las células ciliadas externas, con aparente integridad de las células ciliadas internas.

Los resultados histológicos sugieren que el tratamiento con luteína intratimpánica (1 mg/ml) no parece ejercer un papel protector frente a la ototoxicidad producida por cisplatino.

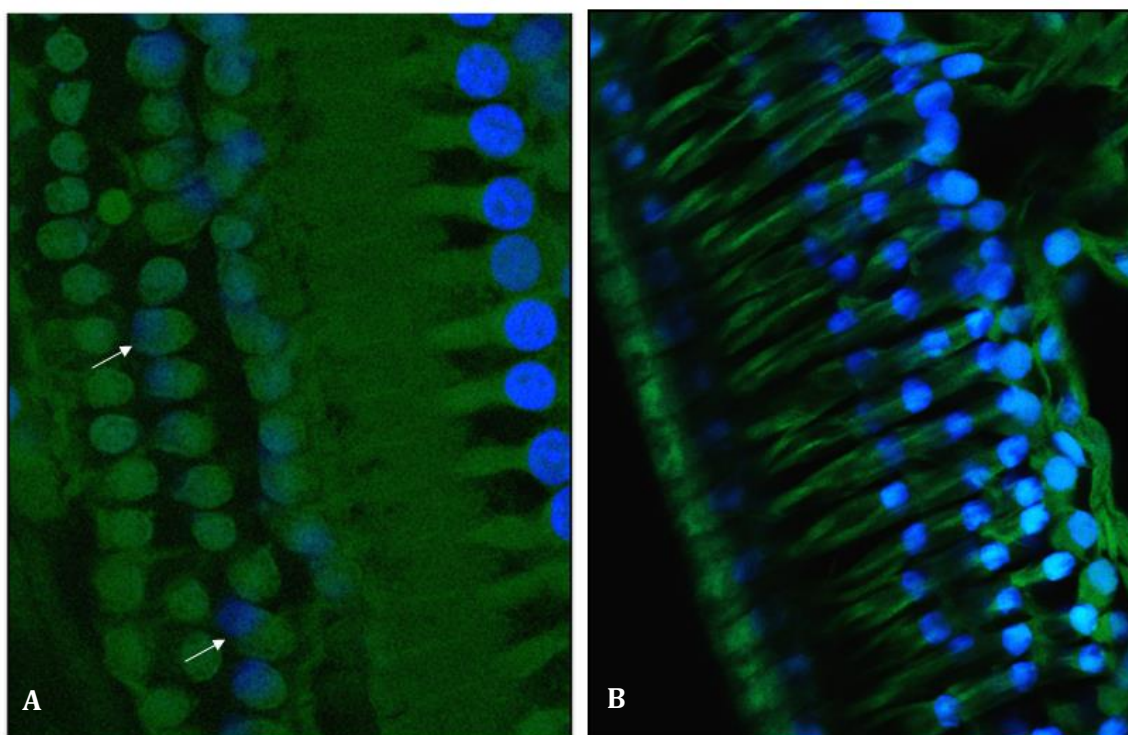


Figura 34. Microfotografías (MCLB) de espira media de oído izquierdo de una rata Wistar tratada con suero salino fisiológico (A) y luteína (B) junto a cisplatino. (A) Se observa la presencia de desestructuración celular con focos de condensación de cromatina (flechas blanca). (B) Se evidencian áreas de desorganización de las células ciliadas externas y superposición de núcleos celulares. Marcado con faloidina y TO-PRO (x180).

4.2.2.3 DIFUSIÓN DE LA LUTEÍNA AL OÍDO INTERNO

El método empleado de cuantificación no ha sido capaz de determinar la cantidad exacta de luteína presente en la perilinfa coclear. Con la técnica de estudio utilizada sólo se pudo determinar la presencia o ausencia de luteína en cada muestra analizada.

Únicamente en la perilinfa de una rata Wistar se objetivó la presencia de luteína. Esta muestra se obtuvo media hora después de la aplicación intratimpánica de la misma.

4.3 SUSTANCIAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS ANIMALES FRENTE A LA OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO

Un total de 97 estudios fueron analizados, 91 de ellos cumplieron los criterios de inclusión. Seis artículos fueron descartados por estar escritos en japonés, no evaluar los resultados histológicos y/o funcionales de la aplicación del fármaco potencialmente otoprotector, estar realizados en cultivos celulares y en pez cebra, o evaluar el efecto del

carboplatino y no el del cisplatino. El primer artículo encontrado sobre otoprotección frente a cisplatino fue el de Ohtani y cols. de 1985.

Como prueba del creciente interés en este tema de investigación se ha observado que 79 de los 91 artículos fueron publicados entre Enero del año 2000 y Mayo del 2014. Hasta dicha fecha, 64 sustancias han sido evaluadas frente a la ototoxicidad por cisplatino en modelos mamíferos animales de experimentación, siendo 40 de ellas sustancias antioxidantes.

4.3.1 MODELO ANIMAL

Los roedores fueron el modelo animal utilizado en los trabajos de experimentación para evaluar la ototoxicidad producida por cisplatino. La especie más empleada fue la rata en 48 de los 91 estudios publicados.

Con el fin de facilitar la lectura de los datos obtenidos, los resultados de los trabajos analizados fueron divididos en dos grandes grupos: los que emplearon distintos modelos de rata y los que utilizaron otras especies animales (Tablas 7-11). El mismo estudio puede aparecer en diferentes tablas o estar repetido dentro de una misma tabla si evalúa diferentes sustancias o si la misma sustancia fue administrada mediante diferentes vías.

En las tablas 7, 8 (ratas) y 9 (coballas, hamster y chinchillas) se recogen los datos de las sustancias antioxidantes. En las tablas 10 (rata) y 11 (cobaya, hamster y ratón) se presentan los de las sustancias no antioxidantes.

Se puede observar que no todas las especies son utilizadas para el estudio de todos los tipos de sustancias. Existe una relación entre el modelo animal empleado y el agente protector evaluado. Los modelos de rata y Chinchilla han sido principalmente utilizados para evaluar sustancias antioxidantes, y los ratones para sustancias no.

El mayor número de animales empleados se observó en los estudios de Whitwork y cols. (2004) y Munguia y cols. (2010), con 47 y 34 animales evaluados respectivamente (Tabla 9). En ambos se empleó la chinchilla como modelo animal.

| Sustancias evaluadas (administración y diferencia con cisplatino) | Modelo animal (n) | Dosis de cisplatino (administración) | Tiempo de seguimiento tras dosis de cisplatino | Medición de la audición (kHz) | Resultados funcionales | Resultados histológicos | Estudio (año) |
|--|---------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Vitamina C (it) 100mg/ml (0.2ml) (30min) | Rata (6) | s16mg/kg (ip) | 3 días | DP (2-8) | + | NE | Celebi (2012) |
| Extracto de granada (po) 100µl (5días) | Rata (6) | m24mg/kg (ip) | 3 días | DP (3-8) | + | + | Yazici (2012) |
| Mezcla de antioxidantes (po) (α-tocoferol 0.25mg, ascorbico 3mg, glutathion 1mg, N-acetylcysteína 60mg) (Ne) | Rata (20) | m10mg/kg (ip) | 7,10,30 días | DP (1-6) | + | + | Lopez-Gonzalez (2000) |
| Melatonina (po/sc) 10mg/ml (250 µg) (Ne) | Rata (20) | m10mg/kg (ip) | 7,10,30 días | DP (1-6) | + | + | Lopez-Gonzalez (2000) |
| Tiosulfato de sodio (iv) 8g/m ² (15min) | Long Evans (NS) | s6mg/kg (iv) | 7 días | PEATC (4-20) | ++ | NE | Dickey (2005) |
| Salicilato de sodio (sc) 100mg/kg (Ne) | Fisher (NS) | m8mg/kg (ip) | 35 días | PEATC (8-35) | ++ | ++ | Minami (2004) |
| KR-22332 (it) 2mM (30min) | Sprague Dawley (4) | s14mg/kg (ip) | 14 días | PEATC (8) | ++ | ++ | Shin (2013) |
| Ebselen (ip) 4,8,12mg/kg (60min) | Sprague Dawley (12) | s14mg/kg (iv) | 3 días | PEATC (8-16)/DP(6-17) | - | NE | Lorito (2011) |
| (ip) NE (Ne) | Rata (NS) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | NE | Rybak (1999a) |
| (o) 20mg/ml (60min) | Fisher (NS) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (2-24) | ++ | ++ | Lynch (2005) |
| D-metionina (ip) 300mg/kg (30min) | Sprague Dawley (8) | s16mg/kg (ip) | 3 días | DP (4-16)/PEATC (8-20) | ++ | ++ | Giordano (2006) |
| (ip) 300/350/400mg/kg (60min) | Sprague Dawley (12) | s14mg/kg (ip) | 3 días | DP(6-17)/PEATC (8-16) | ++ | NE | Lorito (2011) |
| ácido α-lipoico (ip) NS (NS) | Rata (NS) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | NE | Rybak (1999)a |
| L-metionina (ip) 300mg/kg (2 días) | Fisher (8) | m15mg/kg (ip) | 10 días | PEATC (1-18) | ++ | ++ | Li (2001) |
| (it)25mg/ml (2 días) | Fisher (11) | m15mg/kg (ip) | 10 días | PEATC (1-18) | ++ | ++ | Li (2001) |
| Timoquinona (ip) 40mg/kg (2 días) | Sprague Dawley (10) | s15mg/kg (ip) | 3 días | DP (1-8)/PEATC (1-3) | ++ | NE | Sagit (2013) |
| Licopeno (o) 20mg/kg (Ne) | Sprague Dawley (15) | s12mg/kg (ip) | 15 días | DP (1-12) | ++ | ++ | Özkiris (2013) |
| N-Acetilcisteína (ip) 275,375, 475mg/kg (60min) | Sprague Dawley (12) | s14mg/kg (iv) | 3 días | PEATC (8-16)/DP(6-17) | + | NE | Lorito (2011) |
| (iv) 400mg/kg (15min) | Long Evans (14) | s6mg/kg (ip) | 7 días | PEATC (4-20) | ++ | NE | Dickey (2004) |
| Extracto de arándano (o) 200mg/kg (Ne) | Sprague Dawley (15) | s12mg/kg (ip) | 15 días | DP (1.5-12) | ++ | + | Kapusuz (2013) |

++ (otoprotección); - (no otoprotección); + (otoprotección parcial); s (dosis única); m (dosis múltiple); n (número de animales); NE (no evaluado); Ne (no especificado); iv (intravenoso); it (intratimpánico); ip (intraperitoneal); o (oral); sc (subcutáneo); im (intramuscular); n (número de animales); PEATC (Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral); PEAAe (Potenciales Evocados Auditivos de estado estable); DP (Productos de Distorsión).

Tabla 7. Estudios que emplean sustancias antioxidantes utilizando distintos modelos de rata Fisher, Sprague Dawley y Long Evans como modelo experimental.

| Sustancias evaluadas (administración y diferencia con cisplatino) | Modelo animal (n) | Dosis de cisplatino (administración) | Tiempo de seguimiento tras dosis de cisplatino | Medición de la audición (kHz) | Resultados funcionales | Resultados histológicos | Estudio (año) |
|---|-------------------------|--|---|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Vitamina C (ip) 50mg/kg (30min) | Wistar (5) | s15mg/kg (ip) | 3 días | DP (2-4)/ PEATC (1-3) | ++ | NE | <i>Tokgöz (2012)</i> |
| Erdosteina (po) 10mg/kg (0min, 12,24h) | Wistar (9) | s16mg/kg (ip) | 5 días | DP (1-6) | ++ | NE | <i>Kalcioglu (2005)</i> |
| DMSO (it) 0.03ml (30min) | Wistar (7) | s10 mg/kg (ip) | 5 días | PEAee (8-32) | - | - | <i>Roldán- Fidalgo (2014)</i> |
| Ebselen (ip) 16mg/kg (60min) | Wistar (12) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | NE | <i>Rybak (2000)</i> |
| D-metionina (ip) 5,150,300mg/kg (30min) | Wistar (5) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (1-14) | ++ | ++ | <i>Campbell (1996)</i> |
| (ip) 300mg/kg (30min) | Wistar (13) | s16mg/kg (ip) | 7 días | PEATC (4-12) | ++ | ++ | <i>Reser (1999)</i> |
| L- metionina (ip) 300mg/kg (30min) | Wistar (13) | s16mg/kg (ip) | 7 días | PEATC (4-12) | ++ | ++ | <i>Reser (1999)</i> |
| NOX3 siRNA (it) 50µl (48h) | Wistar (NS) | s11mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | ++ | <i>Mukherjea (2010)</i> |
| Aminoguanidina (ip) 50mg/kg (60min) | Wistar (6) | s13mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (16-32) | ++ | NE | <i>Kelly (2003)</i> |
| ácido α-lipoico (ip) 25/50/100mg/kg (30min) | Wistar (17) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | NE | <i>Rybak (1999)b</i> |
| MTBA (ip) 250mg/kg (30min) | Wistar (10) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | NE | <i>Rybak (1997)</i> |
| (ip) 250mg/kg (30min) | Wistar (9) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (2-32) | ++ | ++ | <i>Kamimura (1999)</i> |
| (ip) 250mg/kg (30min) | Wistar (7) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | NE | <i>Rybak (2000)</i> |
| Gingko Biloba (ip)200mg/kg (60min) | Wistar (10) | s13mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (2-32) | + | ++ | <i>Huang (2007)</i> |
| (ip)100mg/kg (NS) | Wistar (10) | s12mg/kg (ip) | 10,17 días | DP (1-8) | ++ | NE | <i>Cakil (2012)</i> |
| Resveratrol (ip) 100mg/kg (30min) | Wistar (5) | s15mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (1.5) | ++ | NE | <i>Simsek (2013)</i> |
| (ip) 10mg/kg (1day) | Wistar (10) | s12mg/kg (ip) | 5 días | DP (1-12) | ++ | NE | <i>Erdem (2011)</i> |
| (po) 0.1,1,10mg/kg (NS) | Wistar (15) | s16mg/kg (ip) | 14 días | DP (1-8) | - | + | <i>Olgun (2014)</i> |
| L-carnitina (sc) 200mg/kg (30min) | Wistar (7) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (6-8) | ++ | ++ | <i>Gunes (2011)</i> |
| (ip) 50mg/kg (30min) | Wistar (5) | s15mg/kg (ip) | 3 días | DP (2-4)/ PEATC 0.1-3) | ++ | NE | <i>Tokgöz (2012)</i> |
| Vitamina B (ip) 2ml/kg (30min) | Wistar (5) | s15mg/kg (ip) | 3 días | DP (2-4)/ PEATC (0.1-3) | ++ | NE | <i>Tokgöz (2012)</i> |
| Sertralina (po) 10mg/kg (7days) | Wistar (15) | s14mg/kg (ip) | 10 días | DP (1-8) | ++ | NE | <i>Ozturk (2013)</i> |
| Vitamina E (it) 4g/kg (0.1-0.3ml) (30min) | Wistar (8) | s20mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-16) | ++ | NE | <i>Paksoy (2011)</i> |
| (ip) 4g/kg (30min) | Wistar (4) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | ++ | <i>Kalkanis (2004)</i> |
| (sc) 50mg/kg (30min) | Wistar (5) | s15 mg/kg (ip) | 3 días | DP (2-4)/ PEATC (0.1-3) | ++ | NE | <i>Tokgöz (2012)</i> |
| GSH (ip) 500,1000, 1500mg/kg (30min) | Wistar (15) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (1-14) | + | + | <i>Campbell (2003)</i> |
| CAPE (ip) 10µmol/kg (0min, 24h) | Wistar (6) | s16mg/kg (ip) | 5 días | DP (1-6) | ++ | NE | <i>Kizilay (2004)</i> |

++ (otoprotección); - (no otoprotección); + (otoprotección parcial); s (dosis única); n (número de animales); NE (no evaluado); Ne (no especificado); iv (intravenoso); it (intratímpanico); ip (intraperitoneal); o (oral); sc (subcutáneo); im (intramuscular); n (número de animales); PEATC (Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral); PEAee (Potenciales Evocados Auditivos de estado estable); DP (Productos de Distorsión); MTBA (ácido 4-metiltiobenzoico); NOX3 (NADPH oxidasa 3); CAPE (derivado fenetil éster del ácido cafeico).

Tabla 8. Estudios que emplean sustancias antioxidantes utilizando ratas Wistar como modelo.

| Sustancias evaluadas (administración y diferencia con cisplatino) | Modelo animal (n) | Dosis de cisplatino (administración) | Tiempo de seguimiento o tras dosis de cisplatino | Medición de la audición (kHz) | Resultados funcionales | Resultados histológicos | Estudio (año) |
|---|-------------------------|--|--|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Ringer lactato (it) NS (30min) | Cobaya (16) | m24mg/kg (ip) | 7 días | PEATC (2-8) | + | + | Nader (2010) |
| (it) 0.2ml (Ne) | Chinchillas (34) | m16mg/kg (ip) | 5,14,30 días | DP (1-16) | - | - | Munguia (2010) |
| (it) 0.2ml (Ne) | Cobaya (14) | m20mg/kg (ip) | 5 días | DP (2-16) | ++ | NE | Choe (2004) |
| Tiourea (it) 27 mg/ml (0min) | Cobaya (20) | m8mg/kg (iv) | 5 días | PEATC (4-16) | + | ++ | Ekborn (2003) |
| Salvia mitioriza (ip) 8g/kg (2 days) | Cobaya (13) | m10mg/kg (ip) | 5 días | PEATC (Ne) | ++ | ++ | Xu (2011) |
| Erdosteina (ip) 200mg/kg (Ne) | Cobaya (18) | s12 mg/kg (ip) | 4 días | PEATC (8-25) | ++ | ++ | Waissbluth (2012) |
| (it) 2.25/4.5mg/cc (15min) | Cobaya (10) | m24mg/kg (ip) | 8 días | PEATC (1-8) | - | - | Saliba (2012) |
| Tiosulfato de sodio (iv) 6-11.6g/m ² (2h después) | Cobaya (13) | s6mg/kg (iv) | 8 semanas | PEATC (2-32) | ++ | NE | Muldoon (2000) |
| (ip) 6-11.6g/m ² (2h después) | Cobaya (8) | s6mg/kg (iv) | 8 semanas | PEATC (2-32) | ++ | NE | Muldoon (2000) |
| (it) 0.6mg/ml (NS) | Cobaya (6) | m10mg/kg (ip) | 5 días | CAP (8)/DP (2-32) | ++ | ++ | Wang (2003) |
| (it) 15mg/ml (200µl) (Ne) | Cobaya (6) | m15mg/kg (ip) | 6 días | DP (1-6) | - | - | Wimmer (2004) |
| (ip) 300mg/kg (30min) | Hamster (10) | s15mg/kg (ip) | 30-35 días | PEATC (2-20) | ++ | ++ | Kaltembach (1997) |
| (ip) 1g/kg (1h después) | Cobaya (10) | m7.5mg/kg (im) | 5 días | NE | NE | + | Saito (1997) |
| (ip) 1.6g/kg (0min) | Cobaya (11) | m12mg/kg (im) | 30 días | PEATC (click) | + | NE | Otto (1988) |
| (it) 0.15ml in HLA gel (3h) | Cobaya (12) | s8mg/kg (iv) | 4 días | NE | NE | ++ | Berglin (2011) |
| (it) 0.75/3mg/ml (0min) | Cobaya (NS) | s0.3mg/ml (it) | 4 horas | CAP/ EP (8) | ++ | NE | Cappaert (2005) |
| Salicilato de sodio (sc) 100mg/kg (90min) | Cobaya (10) | m24mg/kg (ip) | 3 días | DP (1-8) | - | ++ | Hyppolito (2006) |
| Butirato de sodio (ip) 1.2 g/kg (7days) | Cobaya (17) | s14mg/kg (ip) | 14 días | DP (3.5-20) | ++ | NE | Drottar (2006) |
| Pirofosfato de tiamina (ip) 25mg/kg (Ne) | Cobaya (6) | m35mg/kg (ip) | 7 días | NE | NE | ++ | Kuduban (2013) |
| R-PIA/ CCPA/ DPCPX/ CGS (it) 10µl (NS) | Chinchillas (47) | s0.66mg/ml (2µl) (it) | 3 días | PEATC (1- 16kHz) | ++ / ++ / - / - | ++ / ++ / - / - | Whitworth (2004) |
| D-metionina (it) 40mg/ml (200µl) (Ne) | Cobaya (6) | m15mg/kg (ip) | 6 días | DP (1-6) | + | - | Wimmer (2004) |
| (it) Ne (30min) | Chinchillas (13) | s0.66mg/ml (6µl) (it) | 7 días | PEATC (8-16) | ++ | ++ | Korver (2002) |
| Acetilcisteina (it) NS (20%) (30min) | Cobaya (7) | m24mg/kg (ip) | 24 días | PEATC (2-8) | - | - | Nader (2010) |
| (it) 0.2ml (2%) (Ne) | Cobaya (14) | m20mg/kg (ip) | 5 días | DP (2-16) | ++ | NE | Choe (2004) |
| (it) 0.2ml (4%) (30min) | Cobaya (5) | m15mg/kg (ip) | 35 días | PEATC (1-8) | + | ++ | Saliba (2010) |
| Resveratrol (ip) 10mg/kg (2weeks) | Cobaya (6) | s10mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4,8,click) | ++ | ++ | Yumusakhuyulu (2012) |
| Vitamina E (im) 100mg/kg (Ne) | Cobaya (10) | m12mg/kg (ip) | 6 días | PEATC (2-16) | ++ | ++ | Teranishi (2001) |
| (ip) 50mg/kg (12h) | Cobaya (6) | s2.5mg/kg (ip) | 7 días | CAP (2-16) | ++ | ++ | Fetoni (2004)a |
| Trolox (it) 0.3mg/ml (50µl) (NS) | Cobaya (6) | s0.3mg/ml (it) | 3 días | PEATC (4-16) | ++ | ++ | Teranishi (2003) |
| Maytenus ilicifolia (it) 1,3g/kg (1day) | Cobaya (20) | m22.5mg/kg (ip) | 7 días | DP (1-3) | - | - | Kasse (2008) |
| iNOS (ip) 5mg/ml (1h) | Cobaya (6) | s10mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (2-8) | - | + | Watanabe (2000) |
| MTBA (it) 0.1/1mg/ml (0min) | Cobaya (Ne) | s(0.3mg/ml) (it) | 4 horas | CAP/ EP (8) | - | NE | Cappaert (2005) |

++ (otoprotección); - (no otoprotección); + (otoprotección parcial); s (dosis única); m (dosis múltiple); n (número de animales); NE (no evaluado); Ne (no especificado); iv (intravenoso); it (intratímpanico); ip (intraperitoneal); o (oral); sc (subcutáneo); im (intramuscular); n (número de animales); PEATC (Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral); PEAE (Potenciales Evocados Auditivos de estado estable); DP (Productos de Distorsión); CAP (Potencial de acción compuesto); CCPA (2-cloro-N-ciclopentiladenosina); CGS (2-(4-(2-p-carboxi-etilfenilamino)-5'-N-etilcarboxamidoadenosina); DPCPX 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina; R-PIA (R-fenilisopropiladenosina).

Tabla 9. Estudios experimentales que emplean sustancias antioxidantes utilizando cobayas, chinchillas y hamster como modelo experimental.

| Sustancias evaluadas (administración y diferencia con cisplatino) | Modelo animal (n) | Dosis de cisplatino (administración) | Tiempo de seguimiento tras dosis de cisplatino | Medición de la audición (kHz) | Resultados funcionales | Resultados histológicos | Estudio (año) |
|--|----------------------------|--|---|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Dexametasona (it) 4mg/ml (0.1/0.3ml) (30min) | Wistar (8) | s20mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-16) | ++ | NE | <i>Paksoy (2011)</i> |
| (it) 4mg/ml (0.2ml) (48h) | Wistar (12) | s16mg/kg (ip) | 10 días | NE | NE | ++ | <i>Topdag (2012)</i> |
| Epicatequina (it) 2mM (30min) | Sprague Dawley (8) | s14mg/kg (ip) | 14 días | PEATC (8) | ++ | ++ | <i>Lee (2010)</i> |
| AAV vector XIAP(it) 3 µl (Ne) | Sprague Dawley (30) | m12mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | ++ | <i>Chan (2007)</i> |
| XIAP (it) 2-5µl (Ne) | Sprague Dawley (20) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | ++ | <i>Cooper (2006)</i> |
| Cilostazol y extracto de Ginkgo Biloba (o) 180mg/kg (Ne) | Sprague Dawley (Ne) | s16mg/kg (ip) | 5 días | PEATC (16-32) | ++ | ++ | <i>Tian (2013)</i> |
| TRPV1 siRNA (it) 2µl (48h) | Wistar (Ne) | s13mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (2-32) | ++ | ++ | <i>Mukherjea (2008)</i> |
| DDTC (ip) Ne (Ne) | Wistar (Ne) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | NE | <i>Rybak (1999a)</i> |
| (sc) 600mg/kg (60min) | Wistar (9) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (4-32) | ++ | NE | <i>Rybak (2000)</i> |
| Tioprina (im) 300mg/kg (1h después) | Rata Wistar (8) | s2mg/kg (ip) | 8 días | CAP (1-16) | ++ | ++ | <i>Fetoni (2004)b</i> |
| Clorhidrato de memantina (it) 100mg/ml (48h) | Rata Wistar (12) | s16mg/kg (ip) | 10 días | NE | NE | ++ | <i>Topdag (2012)</i> |
| Piracetam (it) 200mg/ml (48h) | Rata Wistar (12) | s16mg/kg (ip) | 10 días | NE | NE | - | <i>Topdag (2012)</i> |
| Alopurinol (o) 0.5-0.6ml (60min) | Rata Fisher (Ne) | s16mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-24) | ++ | ++ | <i>Lynch (2005)</i> |
| Anti-caspasa Asp (ip) 5mg/kg (1 día) | Rata Sprague Dawley (6) | s5 mg/kg (ip) | 7 días | PEAee (8-16)/ PEATC (8) | ++ | ++ | <i>García Berrocal (2010)</i> |
| Fosfomicina (iv) 300mg/kg (Ne) | Rata Fisher (8) | m10mg/kg (iv) | 10 días | NE | NE | ++ | <i>Ohtani (1985)</i> |

++ (otoprotección); - (no otoprotección); n (número de animales); NE (no evaluado); Ne (no especificado); it (intratimpánico); ip (intraperitoneal); o (oral); sc (subcutáneo); im (intramuscular); PEATC (Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral); PEAee (Potenciales Evocados Auditivos de estado estable); DP (Productos de Distorsión); CAP (Potencial de acción compuesto); AAV (Virus Adeno-Asociado); BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro); DDTC (dietilditiocarbamato); GGA (geranio geranio acetona); TRPV1 (receptor de potencial transitorio vaniloide 1); XIAP (Inhibidor de apoptosis ligado al X).

Tabla 10. Estudios que emplean sustancias no antioxidantes utilizando ratas como modelo experimental.

| Sustancias evaluadas (administración y diferencia con cisplatino) | Modelo animal (n) | Dosis de cisplatino (administración) | Tiempo de seguimiento tras dosis de cisplatino | Medición de la audición (kHz) | Resultados funcionales | Resultados histológicos | Estudio (año) |
|---|-------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Dexametasona (it) 0.5ml (30min) | Cobaya (16) | s8mg/kg (ip) | 5 días | PEATC (2-4) | ++ | ++ | Shafik (2013) |
| (it) 4mg/ml (30min) | Cobaya (6) | m12mg/kg(ip) | 3 días | DP (1-6) | ++ | NE | Daldal (2007) |
| (it) 4mg/ml (3 días) | Cobaya (7) | s12mg/kg(ip) | 3 días | DP (1-8) | - | - | Calli (2012) |
| (it) 5-10µl (Ne) | Ratón CBA/J (16) | s14mg/kg(ip) | 7 días | PEATC (8-32) | ++ | NE | Parham (2011) |
| (it) 24mg/ml (Ne) | Ratón CBA/J (15) | m15mg/kg(ip) | 7-28 días | PEATC (1-32) | - | NE | Hughes (2014) |
| (it) 24mg/ml (Ne) | Ratón CBA/J (10) | s14mg/kg(ip) | 8 días | PEATC(8-32) | ++ | NE | Hill (2008) |
| (it) 4,10,40mg/ml (1 día) | Cobaya (6/8/12) | s10-12mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-25) | + | NE | Murphy (2011) |
| Metilprednisolona (it) 625mg/ml (0.2ml) (30min) | Cobaya (5) | m15mg/kg (ip) | 35 días | PEATC (1-8) | - | - | Saliba (2010) |
| Amifostina (ip) 1000mg/kg (Ne) | Cobaya (5) | m30mg/kg (ip) | 28 días | PEATC (click) | ++ | NE | Hussain (2003) |
| Minociclina (ip) 45mg/kg (12h) | Cobaya (6) | s15mg/kg (ip) | 5 días | PEATC (8-32) | ++ | + | Lee (2011) |
| Astragalósidos (ip) 100mg/kg (1h) | Cobaya (10) | s10mg/kg (ip) | 3 días | PEATC (8-32) | ++ | ++ | Xiong (2011) |
| GGA (o) 600mg/kg (Ne) | Cobaya (9) | s10mg/kg (ip) | 7 días | PEATC (NS) | ++ | ++ | Yin (2009) |
| BDNF/ FGF2 (it) 7.5µg (Ne) | Cobaya (6) | m15mg/kg (ip) | 6 días | DP (1-6) | - / - | - | Wimmer (2004) |
| Daflon (o) 100mg/kg (Ne) | Cobaya (8) | s13mg/kg (ip) | 7 días | DP (0.5-8) | ++ | NE | Basoglu (2012) |
| ACTH(ORG2766) (it) 75µg/kg (2min) | Cobaya (12) | m8-12mg/kg (ip) | 10 días | CAP (0.5-16) | ++ | NE | Stengs (1998) |
| (sc) 75µg/kg (2min) | Cobaya (12) | m8-12mg/kg (ip) | 10 días | NE | NE | + | Cardinaal (2000) |
| (ip) 75µg/kg (1min) | Cobaya (11) | m16mg/kg (ip) | 9 días | CAP (0.5-16) | + | NE | Hamers (1994) |
| DTTC/ S-2 WR2721/ Fosfomicina (ip) 300mg/kg (30min) | Hamster (10) | s15mg/kg (ip) | 30 días | PEATC (2-20) | ++ / - / - | + | Kaltembach (1997) |
| Tioprina (im) 300mg/kg (Ne) | Cobaya (6) | s2.5mg/kg (ip) | 7 días | CAP (2-16) | ++ | ++ | Fetoni (2004)a |
| Melanotan-II (sc) 3/30µg/kg (0min) | Cobaya (9/11) | m7.5-27mg/kg (ip) | 5-18 días | EC (8) | - | NE | Wolters (2002) |

++ (otoprotección); - (no otoprotección); + (otoprotección parcial); n (número de animales); NE (no evaluado); Ne (no especificado); it (intratimpánico); ip (intraperitoneal), o (oral); sc (subcutáneo); im (intramuscular); PEATC: Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral; DP: Productos de Distorsión; CAP (Potencial de acción compuesto); ECoG (Electrococleografía); GGA (geranio geranio acetona); BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro); DDTTC (dietilditiocarbamato); S-2 WR2721 (ácido S2 (3-aminopropilamino) etilfosforotioico (amifostina)).

Tabla 11. Estudios que emplean sustancias no antioxidantes utilizando cobayas, chinchillas y ratones como modelo experimental.

4.3.2 SUSTANCIAS PROTECTORAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Las sustancias antioxidantes han sido los principales agentes empleados en estudios preclínicos de experimentación animal frente a la ototoxicidad por cisplatino (Tablas 6-8). Las sustancias más frecuentemente evaluadas fueron la N-acetilcisteína (NAC) (5), el tiosulfato de sodio (9), y la D-methionina (6). La sustancia no antioxidante más frecuentemente evaluada fue la dexametasona (9).

Un gran número de agentes protectores, en distintas dosis y mediante distintas vías de administración, fueron analizados. Las principales vías empleadas fueron la intraperitoneal (36 estudios) y la intratimpánica (32 estudios). La sustancia evaluada se administró antes de la aplicación del cisplatino en la mayoría de los trabajos, excepto en tres trabajos en los que su aplicación fue posterior a la del cisplatino (Saito y cols., 1997; Muldoon y cols., 2000; Fetoni y cols., 2004b).

La evaluación de la sustancia testada en el tejido coclear sólo se llevó a cabo en 5 estudios. La vía intratimpánica se utilizó en el estudio de Mukherjee y cols. (2008, 2010) y en el de Shin y cols. (2012). La vía intraperitoneal se utilizó en el estudio de Minami y cols. (2004) y de Kelly y cols. (2003). Mukherjee y cols. (2008, 2010) y Shin y cols. (2013) evaluaron la presencia del RNA del agente protector en el tejido coclear, utilizando para su cuantificación la hibridación *in situ* con anticuerpos específicos. En los trabajos de Minami y cols. (2004) y de Kelly y cols. (2003) el tejido coclear fue homogeneizado utilizando suero salino fisiológico y *buffer* fosfato respectivamente, y posteriormente centrifugado. El sobrenadante (extracto tisular) fue utilizado para realizar ensayos enzimáticos y análisis bioquímicos. Se evidenció una reducción significativa en la concentración media del protector en el grupo que utilizó cisplatino en combinación con la sustancia evaluada.

Sólo el estudio de Berglin y cols., 2011 evalúa la presencia del agente protector (tiosulfato de sodio) en el líquido perilinfático previa administración trastimpánica del mismo en un gel HYA. En su trabajo se comprueba la difusión de la sustancia desde el gel aplicado en el oído medio al líquido perilinfático del oído interno, donde se alcanzan altas concentraciones de esta sustancia.

4.3.3 DOSIS DE CISPLATINO Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La dosis de cisplatino empleada en los diferentes artículos presenta una gran variabilidad (Tablas 6-10), pasando desde los 2 mg/kg en el estudio de Fetoni y cols. (2004b) a 35 mg/kg en el de Kuduban y cols. (2013).

Cuatro tipos de vías de administración fueron utilizados (intravenosa, intratimpánica, intramuscular e intraperitoneal). Seis estudios utilizaron la vía intravenosa (Ontani y cols., 1985;

Muldoon y cols., 2000; Ekborn y cols., 2003; Dickey y cols., 2005; Lorito y cols., 2011; Berglin y cols., 2011), cuatro la vía intratimpánica (Teranishi y cols., 2003; Withworth y cols., 2004; Cappaert y cols., 2005; Korver y cols., 2002), dos la vía intramuscular (Otto y cols., 1988; Saito y cols., 2007) y el resto de estudios la vía intraperitoneal (Tablas 6-10).

4.3.4 TIEMPO DE EVALUACIÓN TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE CISPLATINO

Existen grandes diferencias en cuanto al tiempo en que se evalúan los resultados tras la administración de cisplatino para ver la efectividad del agente investigado. El tiempo de seguimiento empleado en la mayoría de los trabajos fue de 3 días (Tablas 6-10). Estudios como el de Minami y cols. (2004), Saliba y cols. (2010), Kaltenbach y cols. (1997) u Otto y cols. (1988) emplean tiempos de seguimiento de más de un mes tras la administración de cisplatino.

4.3.5 MEDICIÓN DE LOS RESULTADOS FUNCIONALES

Los principales métodos empleados de evaluación auditiva fueron los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) (52 estudios) y los productos de distorsión (DP) (25 estudios) (Tablas 6-10). Otros métodos utilizados fueron los potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAee) en 2 estudios publicados por nuestro grupo de investigación (García-Berrocal y cols., 2010; Roldán-Fidalgo y cols., 2014), los potenciales de acción compuesta (CAP) en 6 estudios (Wang y cols., 2003; Fetoni y cols., 2004 a y b; Caardinal y cols., 2000; Stengs y cols., 1998; Hamers y cols., 1994) y la electrocoqueografía en 2 estudios (Wolters y cols., 2002; Cappaert y cols., 2005).

Atendiendo a las frecuencias evaluadas en cada artículo, la mayoría valoran los cambios de audición hasta 16 kHz o 32 kHz, mientras que en otros trabajos los cambios auditivos solo se valoraron hasta 8 kHz (Olgun, y cols., 2014; Cakil, y cols., 2012; o López-González, y cols., 2000) (Tablas 6-10).

4.3.6 RESULTADOS FUNCIONALES E HISTOLÓGICOS

En la presente tesis doctoral se ha realizado una revisión narrativa de los resultados funcionales e histológicos obtenidos en cada estudio de experimentación analizado. Debido a la gran variabilidad en las características de los modelos animales empleados, el análisis de la protección alcanzada por cada sustancia ha sido cualitativo (protección significativa vs no otoprotección).

Con respecto a los resultados funcionales, las sustancias antioxidantes obtuvieron mejores niveles de protección que las sustancias no antioxidantes (75% vs 58%). Los resultados histológicos sólo se evaluaron en el 56% de las sustancias antioxidantes y en el 66% de las sustancias no antioxidantes, siendo los resultados alcanzados por ambos grupos similares.

En la mayoría de los estudios en que se evaluaron tanto resultados funcionales como histológicos se obtuvieron los mismos niveles de otoprotección o no otoprotección, excepto en 3 trabajos, en los que los resultados funcionales fueron contrarios a los histológicos (Wimmer y cols., 2004; Hyppolito y cols., 2006; Olgun y cols., 2014) (Tablas 6-10).

Cuando se analizan la protección alcanzada por las sustancias más frecuentemente empleadas, se observa que la vitamina E, el tiosulfato de sodio y la D-metionina alcanzan una buena otoprotección frente a la ototoxicidad por cisplatino. A nivel histológico solo el trabajo de Wimmer y cols. (2004) presenta resultados negativos (Tablas 6-8).

Los estudios que emplean N-acetilcisteína y dexametasona presentan resultados controvertidos. La N-acetilcisteína alcanza un efecto otoprotector a nivel funcional en todos los estudios (protección parcial o completa). Sin embargo sólo en dos trabajos se evaluó su efecto a nivel histológico, obteniéndose resultados opuestos (Nader y cols., 2010; Saliba y cols., 2010) (Tablas 6 y 8). La dexametasona presenta resultados contradictorios tanto a nivel funcional como histológico. A nivel funcional alcanza niveles de otoprotección en 6 de los 9 estudios analizados. En un modelo de cisplatino en el que se emplearon múltiples dosis de administración (semejante al método utilizado en la práctica clínica), la dexametasona no obtuvo resultados de otoprotección frente a cisplatino (Hughes, y cols., 2014). En tres trabajos se valoró su efecto histológico (Dadal, y cols., 2007; Paksoy, y cols., 2011; Topdag, y cols., 2012). En el estudio de Dadal, y cols. (2007) y Topdag, y cols. (2012) se utiliza la misma concentración de dexametasona (4mg/ml) y una dosis similar (0,1-0,2 ml frente a 0.2 ml respectivamente). A pesar de ello, sólo en el estudio de Topdag, y cols. (2012) se observó una reducción del daño histológico producido por el cisplatino sobre las células del oído interno (Tablas 9 y 10).

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5.1 EFECTOS DE LA LUTEÍNA *IN VITRO*

El empleo de células inmortalizadas postnatales (Immortomouse) ha sido validado para el desarrollo de varias líneas celulares auditivas (Barald y cols., 1997; Kalinec y cols., 1999; Lawler y cols., 1999) y minimiza los posibles artefactos causados por los procesos de diferenciación y desdiferenciación de las células maduras (Rivolta y cols., 1998).

Los resultados de los trabajos *in vitro* expuestos demuestran que la luteína es capaz de proteger las células HEI-OC1 frente al cisplatino, pero solo en un rango estrecho de concentraciones (60-80 μM). El empleo de concentraciones inferiores o de concentraciones máximas (100 μM) no presenta ningún efecto beneficioso para las células en cultivo. De hecho, en los ensayos de toxicidad de luteína se observó que la administración de luteína 100 μM es tóxica para la línea celular HEI-OC1. Por tanto, según estos datos, un modelo exitoso *in vivo* debería ser capaz de hacer llegar la luteína a la vecindad del órgano auditivo en concentraciones adecuadas, ni demasiado bajas para que hagan efecto, ni demasiado elevadas para que puedan causar daño celular.

Los resultados positivos del estudio *in vitro* confirman parte las expectativas iniciales acerca de la adecuación de la luteína como otoprotector frente a cisplatino, habida cuenta de sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Vijayapadma, y cols., 2014) y de la relación de las ERO y mediadores inflamatorios en la ototoxicidad por cisplatino (Casares, y cols., 2012). La luteína está presente junto a la zeaxantina en la mácula y el cristalino del ojo humano (Landrum, y cols., 2001; Olmedilla-Alonso, y cols., 2014), donde ejercen una doble función como filtro de rayos ultravioletas y como protector frente a las ERO generadas por esta radiación. La acción antioxidante de la luteína también ha sido descrita bioquímicamente en estudios *in vitro* sobre eritrocitos humanos (Vijayapadma, y cols., 2014) y células epiteliales pigmentarias de retina humana (ARPE-19). El efecto de la luteína en parámetros de estrés oxidativo en animales de laboratorio y cultivos celulares han demostrado que la luteína podría actuar como un reductor de electrones en presencia de ERO y también induciendo la expresión de genes relacionados con una mejor respuesta antioxidante (Serpeloni, y cols., 2014; Aimjongjun, y cols., 2013).

5.2 IDONEIDAD DEL DMSO COMO VEHÍCULO EN ESTUDIOS DE OTOPROTECCIÓN

Numerosos investigadores han evaluado el efecto de distintas sustancias frente al cisplatino, empleando en muchos de estos estudios DMSO como solvente (Uribe y cols., 2013; Nambaran y cols., 2012; Hirose y cols., 2011; Mommin y cols., 2011; Qi y cols., 2008 Parnes y cols., 1999; Pommier y cols., 1988). En el presente trabajo se consideró el DMSO como un

vehículo adecuado para la administración intratimpánica de luteína debido, entre otros factores, a su papel facilitador de la difusión así como a sus propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, beneficiosas para el tratamiento de diversas enfermedades (Salim, 1992a y 1992b; Morassi y cols., 1999; McCammon y cols., 1998; Iwasaki y cols., 1994; Burgues y cols., 1998; Leite y cols., 2007; Broadwell y cols., 1982; Ikeda y Long, 1990).

El DMSO es un reductor del radical hidroxilo y se ha llegado a sugerir que en concentraciones bajas pudiera ser protector en cultivos cocleares (Repine et al., 1981). Sin embargo, la existencia en la literatura de dos trabajos más recientes que desvelaban el efecto tóxico del DMSO sobre células auditivas en cultivo (Qi y cols., 2008) y las células ciliadas de la línea lateral de la larva de pez cebra (Uribe y cols., 2013) hacía necesario estudiar el posible efecto tóxico de esta sustancia en la línea celular HEI-OC1 y en el modelo animal. Hasta el comienzo de este trabajo no se había estudiado la potencial ototoxicidad del dimetilsulfóxido en ningún modelo *in vivo* ni en la línea HEI-OC1, frecuentemente utilizada en ensayos *in vitro* de otoprotección. Qi y cols utilizaron cultivos organotípicos de cóclea extraídos de ratas de 2-3 días de edad. En estos cultivos, el DMSO resultó ser tóxico para las células ciliadas internas y externas a partir de la concentración de 0,5%. Sin embargo, los ensayos de toxicidad de la luteína realizados en el presente trabajo mostraron, en los pocillos control, que el DMSO al 0,5% no era tóxico para las células de la línea HEI-OC1. Las razones por las que esta línea celular parece ser más resistente al efecto de esta molécula que los cultivos organotípicos no quedan claras, require investigaciones adicionales.

El tratamiento con DMSO no produjo toxicidad auditiva en el modelo de rata Wistar usado en la presente tesis doctoral. No se encontró toxicidad auditiva con DMSO al 0,5 y al 1%, ni efectos dañinos para el oído medio según criterios clínicos (inspección microscópica de la membrana timpánica y de la caja del tímpano). Asimismo, se demostró que no potenciaba el efecto ototóxico del cisplatino cuando se administraba en una concentración del 0,5%, al contrario que lo que ocurrió en el trabajo de Uribe y cols (Uribe y cols., 2013). Estas diferencias se puede deber a dos razones principales:

- ✓ Los animales empleados en este trabajo tenía pesos de entre 200 y 250 g, que implican una edad adulta joven. Las células sensoriales del oído de un mamífero adulto son potencialmente más resistentes a la aplicación de cisplatino y DMSO que las células de la línea lateral, muy superficiales, de la larva del pez cebra.
- ✓ En este modelo de rata Wistar, el DMSO entraba en contacto con la membrana de la ventana redonda tras su inyección intratimpánica en el oído medio. La concentración final de DMSO que habría pasado a la rampa vestibular podría ser menor, al tener que

difundir a través de la membrana redonda y pasar a la perilinfa coclear hasta alcanzar las células ciliadas del oído interno en el medio endolinfático.

No se ha encontrado en la literatura científica ningún artículo que evalúe la farmacocinética del DMSO tras su aplicación en el oído medio. Como sugieren algunos autores es difícil conocer la concentración de DMSO dentro de la cóclea en los distintos tiempos de estudio tras su administración (Qi y cols. 2008). Son necesarios, por tanto, futuros estudios sobre farmacocinética del DMSO.

5.3 EFECTOS DE LA LUTEÍNA IN VIVO

Existen muchos trabajos que evalúan los beneficios de la luteína en diferentes patologías del ser humano. La mayoría se han realizado en ensayos clínicos y en estudios *in vitro*, siendo pocos los que han valorado su utilización en modelos animales.

Se conoce que una dieta rica en antioxidantes confiere efectos protectores frente a la patología cardiovascular, dermatológica y oftalmológica (Dwyer, y cols., 2001; Niles, y cols., 2002; Landrum, 2000). La revisión de la literatura científica acerca de estudios que emplean luteína en la dieta o como suplemento alimentario ha demostrado que dicha administración es segura y efectiva. La implicación de las ERO en la ototoxicidad por cisplatino y las similitudes ya mencionadas entre oído interno y retina, hacen que la luteína pueda tener un papel como otoprotector frente a este tratamiento. El potencial antagonismo de la luteína sobre la acción del cisplatino a nivel sistémico podría comprometer su efecto antitumoral, razón por la que se eligió la vía de administración intratimpánica en este estudio.

Este es el primer trabajo que evalúa el efecto de la administración intratimpánica de luteína en un modelo animal de ototoxicidad por cisplatino. Debido a ello, no se han encontrado referencias en cuanto a la dosis idónea a emplear mediante esta vía de administración. En otros modelos de enfermedad no otológica se han empleado concentraciones variables de luteína según los distintos estudios, con vías de administración también variables. Desde 0,1mg/ml subcutáneo en un modelo de inflamación auricular en el ratón (Horvath y cols., 2012), 1mg/ml inyectado localmente en un modelo de exposición ocular a luz azul en rata (Wang y cols., 2008; Xu y Lin, 2010) hasta 15 mg/día por vía oral (Olmedilla y cols., 2002; 2003). La dosis utilizada por Wang y Xu (1mg/ml) fue la elegida en el presente trabajo para el estudio *in vivo*. Aunque es sabido que la línea HEI-OC1 es muy sensible a ototóxicos, los datos de toxicidad *in vitro* con luteína 100 μ M indican que la administración de este fármaco a dosis superiores podría lesionar las células del oído interno.

La administración intratimpánica aislada de luteína a la concentración empleada no produjo cambios estadísticamente significativos en la audición de los animales de experimentación ni alteraciones morfológicas reseñables.

Cuando se administró la luteína intratimpánica en combinación con el cisplatino intraperitoneal, no se encontró potenciación del efecto lesivo de éste sobre el oído interno. Tampoco se observó una disminución de la toxicidad celular producida por el mismo. Aunque los umbrales auditivos del oído tratado con luteína (OD) descendían menos que los del oído control tratado con suero salino, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El hecho de que la luteína haya demostrado un efecto protector frente a cisplatino en la línea *in vitro*, pero no *in vivo*, sugiere dos posibilidades:

1) La luteína no es capaz de ejercer un efecto protector en el órgano de Corti de la rata Wistar;
2) La luteína administrada no ha llegado en suficiente concentración al medio líquido del órgano de Corti en los sujetos de experimentación. De hecho, sólo se detectó luteína en una muestra extraída media hora después de la administración intratimpánica. Algunos factores que podrían explicar la baja tasa de detección perilinfática y el mínimo efecto otoprotector son:

- ✓ Una dosis administrada absoluta insuficiente, dado el pequeño volumen de la caja timpánica en la rata (0,03 ml)
- ✓ Un defecto en la difusión de la luteína a través de la membrana de la ventana redonda (a pesar del efecto facilitador de la difusión del DMSO). Este defecto de difusión podría estar relacionado con el elevado peso molecular de la luteína, a pesar de su gran liposolubilidad.
- ✓ Una difusión temprana de la luteína al interior de las células cocleares que hiciera que la sustancia no estuviera presente en el líquido coclear pasados 30 minutos después de su administración (menos probable que las anteriores, dado el escaso efecto protector comprobado en el modelo *in vivo*).
- ✓ Una escasa capacidad de detección del aparato debido a la pequeña cantidad de líquido que podía extraerse de las cócleas.

A pesar de los buenos resultados que describen múltiples autores en otras patologías debido a su efecto antioxidante, los resultados del presente trabajo no podemos concluir que la administración intratimpánica de 0,03 ml de una solución de luteína a la concentración de 1 mg/ml tenga un papel protector frente a la ototoxicidad por cisplatino en este modelo de rata Wistar. Un conocimiento más detallado de los procesos moleculares de la acción del cisplatino

podría aclarar si la administración de una sustancia determinada es efectiva para algunos procesos y no para otros.

Futuras investigaciones podrían valorar diversas modificaciones del diseño de este estudio:

- ✓ Empleo de otros modelos animales de mayor tamaño corporal y con una mayor capacidad del oído medio, con el fin de permitir una mayor dosis absoluta de luteína.
- ✓ Uso de otros solventes distintos al DMSO (como el Tween), con el fin de determinar si la solubilidad de la luteína es mayor y pueden utilizarse concentraciones más elevadas. El empleo de otros solventes obligaría, sin embargo, al establecimiento de grupos de control con el fin de determinar la eventual ototoxicidad de los mismos, y para comprobar que no tienen un efecto dañino en el oído medio.
- ✓ La nanoencapsulación de las moléculas de luteína podría mejorar su solubilidad en DMSO, así como su estabilidad.

5.4 MODELOS MAMÍFEROS DE OTOPROTECCIÓN FRENTE A CISPLATINO

La ototoxicidad producida por cisplatino es un frecuente efecto secundario de este tratamiento quimioterápico y ocasionalmente motivo de la suspensión del mismo. Se han investigado una gran variedad de estrategias farmacológicas para proteger las estructuras cocleares durante el tratamiento con cisplatino, a pesar de lo cual no hay actualmente ningún protocolo de prevención.

Antes de la realización de un ensayo clínico para testar un nuevo tratamiento en humanos, parece razonable recopilar los resultados relevantes previamente obtenidos sobre estas sustancias en estudios experimentales, valorando la seguridad y eficacia de su administración. Uno de los principales problemas al pasar de estudios de experimentación animal a ensayos clínicos es la existencia de importantes diferencias entre ambos. Los ensayos preclínicos con animales implican probar efectos sobre cuestiones específicas de la función fisiológica. Las implicaciones éticas que conlleva la realización de estos estudios, limitan el número de animales al mínimo posible y requieren que los estudios eviten repetir los mismos objetivos ya publicados en trabajos anteriores. La realización de una revisión narrativa en este tipo de trabajos recopilando todos los datos relevantes obtenidos, permite evaluar los resultados alcanzados en los distintos estudios experimentales sin necesidad de combinar entre sí las heterogeneas variables evaluadas en cada uno de ellos.

Hasta la fecha no se ha encontrado un estudio de la literatura que recoja los resultados obtenidos por los diferentes trabajos de investigación animal en otoprotección frente a cisplatino. Una reciente publicación de Chirtes y Albu en el año 2014 evalúa los estudios experimentales que se realizaron entre el año 2004 y el 2014. Esta revisión presenta algunos fallos metodológicos, ya que no indica cuáles fueron los criterios de exclusión e inclusión de los estudios ni explica el objetivo principal del trabajo. Además, artículos que están publicados dentro del periodo temporal de la revisión no aparecen referidos ni el texto ni como parte de la bibliografía. Algunos ejemplos son los trabajos de Celebi y cols. (2012), Tokdog y cols. (2012), Kalcioglu y cols. (2005), Lorito y cols. (2011) y Simsek y cols. (2013). Por todo ello no se puede considerar como una revisión narrativa de referencia.

Ya se han realizado estudios clínicos en humanos utilizando sustancias previamente testadas en animales como la N-acetilcisteína, aminofostina y dexametasona (Marsahk, y cols., 2014; Yoo, y cols., 2014; Van As, y cols., 2012; Marina, y cols., 2005), con resultados controvertidos. La revisión sistemática de Van As y cols. (2012) acerca de la eficacia de la aminofostina en el tratamiento quimioterápico en pacientes en edad pediátrica, no evidenció resultados protectores con su administración.

La presente tesis doctoral recoge los estudios de experimentación animal sobre otoprotección frente a cisplatino en modelos animales mamíferos publicados en Medline hasta Mayo de 2014. Con esta revisión se pretendió analizar cuáles son las sustancias que ya han sido evaluadas frente a cisplatino y los resultados obtenidos por cada una de ellas, para evitar la repetición de estudios de investigación, ahorrar costes innecesarios y permitir dirigir los futuros estudios hacia la línea farmacológica más efectiva. El modelo de pez cebra está siendo utilizado por varios grupos de investigación como modelo de cribado de ototoxicidad de fármacos y para el estudio de las vías de señalización de la apoptosis celular en las células sensoriales debido a la facilidad de visualización de las células ciliadas de la línea lateral. Sin embargo, la similitud anatómica e histológica de oído medio y cóclea entre los roedores y la especie humana, hacen que hayan sido elegidos como principal modelo para evaluar el efecto de diferentes sustancias frente a la ototoxicidad por cisplatino.

Cada grupo de investigación otológica utiliza diferentes modelos animales, vía de administración, dosis de fármaco protector, y periodos de seguimiento para la evaluación de los resultados. Sería necesario añadir recursos adicionales, como los empleados satisfactoriamente en los estudios preclínicos farmacocinéticos, para mejorar los modelos animales existentes (Mc Gonigle and Ruggeri, 2014), facilitando así la realización de estudios transnacionales.

Sustancia empleadas

Existe un gran número de sustancias evaluadas frente a la ototoxicidad por cisplatino, siendo los agentes antioxidantes los más frecuentemente utilizados, alcanzando en conjunto mejores niveles de otoprotección que las sustancias no antioxidantes. Debido a que la producción de ERO tras la administración de cisplatino es uno de los principales mecanismos de apoptosis celular de las células sensoriales del oído interno (Casares, y cols., 2012), existe una clara justificación del estudio de estas sustancias en modelos preclínicos de experimentación animal.

La vitamina E, el tiosulfato de sodio y la D-metionina presentaron buenos resultados otoprotectores frente a la toxicidad por cisplatino en modelos animales. La NAC presenta resultados ambiguos en los estudios en los que se evalúa su efecto histológico. El empleo de altas concentraciones de NAC en el estudio de Nader y cols. (2010) provocó la aparición de una lesión del oído medio y del oído interno mayor que la producida por la administración aislada de cisplatino. En el trabajo de Saliba y cols. (2010) se evidenció una reducción de la ototoxicidad producida por cisplatino tanto en el oído control como en el oído tratado con NAC trastimpánica. Este hecho parece deberse a la difusión de la NAC por el líquido cefaloraquídeo al oído contralateral.

La dexametasona fue el agente no antioxidante más frecuentemente empleado. Los corticoides, y en especial la dexametasona son ya utilizados en el tratamiento de muchas condiciones otológicas incluyendo la sordera súbita, la enfermedad inmunomediada del oído interno, la hipoacusia inducida por ruido, la enfermedad de Ménière y la ototoxicidad por aminoglucósidos (Himeno, y cols., 2002; Chandrasekhar, y cols., 2000). La presencia de receptores de corticoides en estructuras del oído interno del ratón refuerza la hipótesis de que los corticoides puedan tener un papel en la patología otológica (Hagunani, y cols., 2006); sin embargo los resultados de los estudios de otoprotección frente a cisplatino sólo evidencian resultados positivos en 6 de los 9 estudios realizados. Sobre las células tumorales los corticoides tienen un efecto regulador de los genes apoptóticos, por lo que su administración sistémica junto a cisplatino podría resultar en una disminución de las propiedades antitumorales del mismo (Her, y cols., 2003). Por este motivo la vía de elección para la administración de dexametasona en todos los estudios evaluados fue la vía intratimpánica.

Vía de administración

La vía de administración intratimpánica es un método simple y seguro que permite la difusión del agente a estudio a través de la ventana redonda hacia el oído interno, donde ésta puede ejercer su función. Este método obtiene niveles más altos de concentración de la sustancia

en el oído interno que los alcanzados con la administración oral o parenteral (Paksoy, y cols., 2011) y proporciona un acceso directo a las estructuras del oído interno evitando los efectos secundarios de estas sustancias a nivel sistémico y la posible interferencia con el efecto antitumoral del cisplatino (Rybak, y cols., 2009; Wimmer, y cols., 2004). Esta vía de administración también presenta factores limitantes, como son la pérdida de la sustancia una vez aplicada en el oído medio a través de la trompa de Eustaquio, el acueducto coclear o el paso al torrente circulatorio y la dificultad de determinar la concentración final de la sustancia que pasa al oído interno. Además, se ha observado que algunas sustancias pueden producir una inflamación en el oído medio tras su administración (Riga y cols., 2013).

La presencia del agente a estudio en la perilinfa coclear tras su administración intratimpánica se evaluó en el estudio de Berglin y cols. (2011), y en sólo en 5 trabajos se valora su presencia en el tejido coclear. Sería interesante estudiar el paso de cada sustancia desde el oído medio al oído interno tras su administración intratimpánica con el fin de determinar qué factores favorecen la difusión de cada sustancia y la cantidad que alcanza el oído interno, valorando si la ausencia de protección se debe a una falta de efectividad o bien a problemas en la difusión de la sustancia.

Dosis empleada y tiempo de seguimiento

Cada grupo de investigación emplea una dosis farmacológica y un tiempo de seguimiento diferentes, siendo estas cifras muy variables de un trabajo a otro. La dosis de cisplatino empleada en los estudios de experimentación animal varía desde los 2 mg/kg (Fetoni y cols., 2004b) hasta los 35 mg/kg (Kuduban, y cols., 2013). Es bien conocido que la administración crónica de cisplatino produce menos lesión celular que la administración aguda del mismo (Tokgöz, y cols., 2012; Saito, y cols., 1994), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la administración de cisplatino en dosis única o múltiple. (Tablas 6-10).

El tiempo de seguimiento en los diferentes estudios abarca desde los 3 días hasta las 8 semanas (Muldoon, y cols., 2000). Estas diferencias podrían subestimar o sobrestimar el efecto alcanzado por las sustancias evaluadas. Además el empleo de un periodo de seguimiento más largo genera mayores costes económicos tanto por el desarrollo del proceso experimental como por el coste que supone el mantenimiento de los animales en el laboratorio.

Las normas éticas vigentes actualmente limitan el número de animales utilizados en los trabajos de experimentación animal al mínimo imprescindible (Lemon y Dunnett, 2005). Por ello, sería necesario determinar el tiempo mínimo de seguimiento en el que se pueda observar la aparición de ototoxicidad tras la administración de cisplatino en cada especie animal de

roedores y la dosis máxima de cisplatino a partir de la cual el empleo conjunto de un agente otoprotector deja de ser efectivo, con el fin de evitar costes innecesarios.

Resultados funcionales e histológicos

Muchos de los trabajos utilizan los PEATC y los Productos de Distorsión para evaluar la variación de la audición en animales tratados con cisplatino. Los PEAAe permiten diferenciar las variaciones auditivas producidas tras el tratamiento en cada frecuencia por separado aportando información adicional sobre las frecuencias más graves del espectro auditivo. Por ello se plantea como una alternativa válida para la evaluación de los cambios auditivos que experimentan los animales en estudios de ototoxicidad.

Existe una distribución tonotópica coclear en cada especie animal. La ototoxicidad por cisplatino suele afectar primero a la espira basal de la cóclea (frecuencias agudas) y progresar posteriormente a la porción apical (frecuencias graves). Un gran número de trabajos de experimentación que evalúan el papel protector de distintas sustancias miden frecuencias hasta 16 y 32 kHz (Tablas 1-4). Frecuencias entre 8 y 32 kHz, corresponden a una pequeña porción de la espira basal y media de la cóclea de la rata (Viberg, y cols., 2004). En cobayas la frecuencia de 6 kHz representa aproximadamente el 50% de la distancia coclear medida desde el ápex (Greenwood, y cols., 1990). En ratones la frecuencia de 32 kHz es aproximadamente el 70% de la longitud coclear, los 16 kHz el 43%, y los 8 kHz el 18% (Muller, y cols., 2005). Las frecuencias agudas se codifican en áreas cocleares cercanas a la base; al ser las frecuencias afectadas inicialmente por el tratamiento con cisplatino, su estudio es de gran importancia (Hill, y cols., 2008). Los estudios que sólo miden cambios de audición hasta 8 kHz valoran sólo una pequeña porción coclear, diferente según la especie animal utilizada, y podrían subestimar el efecto protector de la sustancia investigada.

En algunos trabajos, el efecto protector de la sustancia evaluada solo se alcanza en una frecuencia aislada (Erdem, y cols., 2011; Lee, y cols., 2011; Teranishi, y cols., 2001; Kelly, y cols., 2003; Shin, y cols., 2013; Murphy, y cols., 2011 o Celebi, y cols., 2012). Estos resultados deben ser evaluados cuidadosamente en futuros estudios de investigación, ya que sería necesario determinar el impacto real de la ganancia auditiva en una frecuencia aislada en la práctica clínica habitual.

5.5 CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN CANDIDATO A OTOPROTECTOR

Con el conocimiento actual podemos decir para que una sustancia sea efectiva como otoprotector debe poseer tres características fundamentales:

1. Ejercer un efecto antagonista de la cascada apoptótica desencadenada por el cisplatino sobre el oído interno, o bien un efecto eliminador de radicales libres y reductor de especies reactivas de oxígeno, sin alterar su efecto anti-tumoral a nivel sistémico.
2. Poseer características moleculares que la permitan atravesar la membrana de la ventana redonda de la manera más sencilla posible, idealmente de pequeño tamaño y muy lipofílica.
3. No ser tóxica ni irritante para el oído medio, así como su solvente.

La revisión bibliográfica realizada de los estudios de experimentación animal pone de manifiesto que sustancias antioxidantes como la D-metionina, el tiosulfato de sodio o la vitamina E pueden ser buenos candidatos en futuros estudios de experimentación.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Con este trabajo se ha evaluado, por primera vez, el efecto que obtiene la aplicación de luteína sobre cultivos de células cocleares y en un modelo animal de rata Wistar.
2. Se ha podido comprobar que la administración de luteína no es tóxica para el oído interno tanto en estudios funcionales como histológicos.
3. La administración de 1 mg/ml de luteína por vía intratimpánica junto con cisplatino intraperitoneal no ha conseguido alcanzar niveles de otoprotección. Futuras investigaciones con diferentes dosis y concentraciones de luteína serían necesarias para confirmar estos resultados.
4. La administración intratimpánica de DMSO al 1% no es perjudicial para el oído interno. La administración de DMSO al 0.5% no potencia ni protege frente al efecto ototóxico del cisplatino, cuando se administra concomitantemente en un modelo animal de rata Wistar. Según nuestros resultados, la utilización de DMSO como solvente de sustancias hidrofóbicas en estudios de otoprotección animal es segura.
5. Las sustancias antioxidantes son los agentes más frecuentemente utilizados en los estudios de ototoxicidad frente a cisplatino.
6. La vía de administración intratimpánica se postula como la vía de elección para la administración de sustancias otoprotectoras frente a la toxicidad por cisplatino.
7. Existe una gran heterogeneidad en el diseño de los distintos estudios de experimentación animal, dificultando enormemente la comparación de los resultados obtenidos por los distintos fármacos evaluados en cada uno de ellos. Sería preciso estandarizar los protocolos de estudio con el fin de facilitar la realización de revisiones sistemáticas.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aimjongjun, S., Sutheerawattananonda, M., Limpeanchob, N. (2013). Silk lutein extract and its combination with vitamin E reduce UVB-mediated oxidative damage to retinal pigment epithelial cells. *J Photochem Photobiol B* 5, 24: 34-41.
- Albiin, N., Hellström, S., Stenfors, L.E., Cerne, A. (1986). Middle ear mucosa in rats and humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 126, 2-15.
- Aleman, T.S., Duncan, J.L., Bieber, M.L., de Castro, E. y cols. (2001). Macular pigment and lutein supplementation in retinitis pigmentosa and Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1873-81.
- Al-Khatib, T., Cohen, N., Carrte, A., y cols. (2010). Cisplatin ototoxicity in children, long-term follow up. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 74, 913-9.
- Alves-Rodrigues, A., Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicol Lett* 150, 57-83.
- Alzamil, K.S., Linthicum, F.H. (2000). Extraneous round window membranes and plugs: possible effect on intratympanic therapy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109, 30-2.
- American Speech-Language-Hearing Association (1994). *Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy*. ASHA 36, 11-19.
- Arnold, A. y cols. (2013), Inner ear. Capítulo 1, páginas 129. En: Anniko, M. y cols. *Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, European Manual of Medicine*. Germany. Ed. Springer.
- Barald, K.F., Lindberg, K.H., Hardiman, K., Kavka, A.I., Lewis, J.E., y cols. (1997). Immortalized cell lines from embryonic avian and murine otocysts: tools for molecular studies of the developing inner ear. *Int J Dev Neurosci* 15, 523-40.
- Basile, A.S., Huang, J.M., Xie, C., Webster, D., Berlin, C., Skolnick, P. (1996). N-methyl-D-aspartate antagonist limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. *Nat Med* 2, 1338-43.
- Başoğlu, M.S., Eren, E., Aslan, H., Bingölballı, A.G., Öztürkcan, S., Katılmış, H. (2012). Prevention of cisplatin ototoxicity: Efficacy of micronized flavonoid fraction in a guinea pig model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76, 1342-6.
- Beatty, S., Boulton, M., Henson, D., Kob, H.H., Murray, I.J. (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 83, 867-77.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45, 115-34.

- Behnoud, F., Davoudpur, K., Goodarzi, M.T. (2009). Can aspirin protect or at least attenuate gentamicin ototoxicity in humans?. *Saudi Med J* 30, 1165-9.
- Berglin, C.E., Pierre, P.V., Bramen, T., Edsman, K., Ehrsson, H., y cols. (2011). Prevention of cisplatin-induced hearing loss by administration of a thiosulfate-containing gel to the ear in guinea pig model. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 1547-56.
- Bertolaso, L., Martini, A., Bindini, D., Lanzoni, I., Parmeggiani, A., Vitali, C., y cols. (2001). *Audiology* 40, 327-35.
- Best, V., Carlile, S., Jin, C., Van Schaik, A. (2005). The role of high frequencies in speech localization. *J Acoustic Soc Am* 118, 353-63.
- Bird, P.A., Begg, E.J., Zhang, M., Keast, A.T., Murray, D.P., Balkany, T.J. (2007). Intratympanic versus intravenous delivery of methylprednisolone to cochlear perilymph. *Otol Neurotol* 28, 1124-30.
- Blakley, B.W., Cohen, J.I., Doolittle, N.D., Muldoon, L.L., Campbell, K.C., Dickey, D.T. y cols. (2001). Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy: review and summary of the annual meeting of the Blood-Brain Barrier Disruption Program, Gleneden Beach, Oregon, March 10, 112: 1997-2001.
- Blakley, B.W., Gupta, A.K., Myers, S.F., Schwan, S. (1994). Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 541-6.
- Boëda, B., Weil, D., Petit, C. (2001). A specific promoter of the sensory cells of the inner ear defined by transgenesis. *Hum Mol Genet* 15, 10: 1581-9.
- Bokemeyer, C., Berger, C.C., Hartmann, J.T., Kollmannsberger, C., Schmoll, H.J. y cols. (1998). Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br J Cancer* 77, 1355-62.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9, 1551-8.
- Broadwell, R.D., Salcman, M., Kaplan, R.S. (1982). Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science* 217, 164-6.
- Brock, P.R., Knight, K.R., Freyer, D.R., Campbell, K.C., Steyger, P.S., y cols. (2012). Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. *J Clin Oncol* 1, 30: 2408-17.

- Broughton, S.S., Meyerhoff, W.E., Cohen, S.B. (2004). Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum* 34, 544-8.
- Burgues, J.L., Hammer, A.P., Robertson, W.O. (1998). Sulfhemoglobinemia after dermal application of DMSO. *Vet Hum Toxicol* 40, 87-9.
- Cai, J., Nelsno, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jones, D.P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 19, 205-21.
- Cakil, B., Basar, F.S., Atmaca, S., Cengel, S.K., Tekat, A., Tanyeri, Y. (2012). The protective effect of Ginkgo biloba extract against experimental cisplatin ototoxicity: animal research using distortion product otoacoustic emissions. *J Laryngol Otol* 126, 1097-101.
- Calli, C., Pinar, E., Oncel, S., Alper Bagriyanik, H., Umut Sakarya, E. (2012). Recovery of Hearing in cisplatin-induced ototoxicity in the guinea pig with intratympanic dexamethasone. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 64, 46-50.
- Campbell, K.C., Larsen, D.L., Meech, R.P., Rybak, L.P., Hughes, L.F. (2003). Glutathione ester but not glutathione protects against cisplatin-induced ototoxicity in a rat model. *J Am Acad Audiol* 14, 124-33.
- Campbell, K.C., Rybak, L.P., Meech, R.P., Hughes, L. (1996). D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hear Res* 102, 90-8.
- Canlon, B., Dulon, D. (1993). Dissociation between the calcium-induced and voltage-driven motility in cochlear outer hair cells from the waltzing guinea pig. *J Cell Sci* 104, 1137-43.
- Cappaert, N.L., Klis, S.F., Wijnenga, J., Smoorenburg, G.F. (2005). Acceleration of cisplatin ototoxicity by perilymphatic application of 4-methylthiobenzoic acid. *Hear Res* 203, 80-7.
- Cardinaal, R.M., De Croot, J.C., Huizing, E.H., Veldman, J.E., Smoorenburg, G.F. (2000). Histological effects of co-administration of an ACTH ((4-9) analogue, ORG2766) on cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. *Hear Res* 144, 157-67.
- Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E., García-Berrocal, J.R. (2012). Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269, 2455-9.
- Celebi, S., Gurdal, M.M., Ozkul, M.H., Yasar, H., Balikci, H.H. (2012). The effect of intratympanic vitamin C administration on cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270, 1293-7.
- Chan, D.K., Lieberman, D.M., Musatov, S., Goldfein, J.A., Selesnick, S.H., Kaplitt, M.G. (2007). Protection against cisplatin-induced ototoxicity by adeno-associated virus-mediated

- delivery of the X-linked inhibitor of apoptosis protein is not dependent on caspase inhibition. *Otol Neurotol* 28, 417-25.
- Chandrasekhar, S.S. (2001). Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation. *Otol Neurotol* 22, 18-23.
- Chandrasekhar, S.S., Rubinstein, R.Y., Kwartler, J.A., y cols. (2000). Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122, 521-8.
- Chang, J., Jung, H.H., Yang, J.Y., Lee, S., Choi, J., Im, G.J., Chae, S.W. (2014). Protective effect of metformin against cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. *J Assoc Res Otolaryngol* 15, 149-58.
- Chen, X., Frisina, R.D., Bowers, W.J., Frisina, D.R., Federoff, H.J. (2001). HSV amplicon-mediated neurotrophin-3 expression protects murine spiral ganglion neurons from cisplatin-induced damage. *Mol Ther* 3, 958-63.
- Chi, F.L., Yang, M.Q., Zhou, Y.D., Wang, B. (2011). Therapeutic efficacy of topical application of dexamethasone to the round window niche after acoustic trauma caused by intensive impulse noise in guinea pigs. *J Laryngol Otol* 125, 673-85.
- Chin, L.L., Cunningham, L.L., Raible, D.W., Rubel, E.W., Ou, H.C. (2008). Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol* 9, 178-90.
- Chirtes, F., Albu, S. (2014). Prevention and restoration of hearing loss associated with the use of cisplatin. *Biomed Res Int* 22.
- Chiu, L.L., Cunningham, L.L., Raible, D.W., Rubel, E.W., Ou, H.C. (2008). Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol* 9, 178-90.
- Choe, W.T., Chinosornvatana, N., Chang, W. (2004). Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol* 25, 910-15.
- Choi, J., Kim, S.H., Rah, Y.C., Chae, S.W., Lee, J.D., Md, B.D., Park, M.K. (2014). Effects of caffeic acid on cisplatin-induced hair cell damage in HEI-OC1 auditory cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 78, 2198-204.
- Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., Sperling, M., Holtkamp, M., Edemir, B. y cols. (2010). Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interpretations. *Am J Pathol* 176, 1169-80.
- Clerici, W.J., DiMartino, D.L., Prasad, M.R. (1995). Direct effect of reactive oxygen species on cochlear outer hair cells. *Hear Res* 84, 30-40.

- Coffin, A.B., Ou, H., Owens, K.N., Santos, F., Simon, J.A., Rubel, E.W., Raible, D.W. (2010). Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. *Zebrafish* 7, 3-11.
- Cooper, L.B., Chan, D.K., Roediger, F.C., Schaffer, B.R., Fraser, J.F., Musatov, S. y cols. (2006). AAV-mediated delivery of the caspase inhibitor XIAP protects against cisplatin ototoxicity. *Otol Neurotol* 27, 484-90.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Li, K., Sawamura, D., Giudice, G.J., Chu, M.L., y cols. (1993). Chromosomal localization of mouse bullous pemphigoid antigens. BPAG1 and BPAG2: identification of a new region of homology between mouse and human chromosomes. *Genomics* 15, 180-1.
- Cunningham, L.L., Brandon, C.S. (2006). Heat shock inhibits both aminoglycoside and cisplatin-induced sensory hair cell death. *J Assoc Res Otolaryngol* 7, 299-307.
- Daldal, A., Odabasi, O., Serbetcioglu, B. (2007). The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 137, 747-52.
- Devarajan, P., Savoca, M., Castaneda, M.P., Park, M.S., Esteban-Cruciani, N., Kalinec, y cols. (2002). Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 174, 45-54.
- Dickey, D.T., Mulddon, L.L., Kraemer, D.F., Neuwelt, E.A. (2004). Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res* 193, 24-30.
- Dickey, D.T., Wu, J.Y., Muldoon, L.L., Neuwel, E.A. (2005). Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, celular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp* 314, 1052-8.
- Dilsiz, N., Sahaboglu, A., Yildiz, M.Z., Reichenbach, A. (2006). Protective effects of various antioxidants during ischemia-reperfusion in therat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244, 627-33.
- Ding, D., Stracher, A., Salvi, R.J. (2002). Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity. *Hear Res* 164, 115-26.
- Doolittle, N.D., Muldoon, L.L., Brummett, R.E., y cols. (2001). Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin Cancer Res* 7, 493-500.
- Doyle, K.J., Bauch, C., Battista, R. y cols. (2004). Intratympanic steroid treatment:a review. *Otol Neurotol* 25, 1034-9.

- Dreher, F., Maibach, H. (2001). Protective effects of topical antioxidants in humans. *Curr Probl Dermatol* 29, 157-64.
- Drottar, M., Liberman, M.C., Ratan, R.R., Roberson, D.W. (2006). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate protects against cisplatin-induced hearing loss in guinea pig. *Laryngoscope* 116, 292-6.
- Duncam, I.L., Aleman, T.S., Gardner, L.M., De Castro, E., Marks, D., Emmons, I.M. y cols. (2002). Macular pigment supplementation in choroideremia. *Exp Eye Res* 74, 371-81.
- Dwyer, J.H., Navab, M., Dwyer, K.M., Hassan, K., Sun, P., Shicore, A., y cols. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis study. *Circulation* 103, 2922-7.
- Ekbom, A., Laurell, G., Johnstrom, P., Wallin, I., Eksborg, S., Ehrsson, H. (2002). D-Methionine and cisplatin ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences cisplatin pharmacokinetics. *Hear Res* 165, 53-61.
- Ekbom, A., Laurell, G., Ehrsson, H., Miller, J. (2003). Intracochlear administration of thiourea protects against cisplatin-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear Res* 181, 10915.
- Erdem, T., Bayindir, T., Filiz, A., Iraz, M., Selimoglu, E. (2011). The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269, 2185-8.
- Evans, J.R., Lawrenson, J.G. (2012). Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 13, 6.
- Faulhaber, D. (2001). *Lutein inhibits UVB radiation-induced tissue swelling and suppression of the induction of contact hypersensitivity (CHS) in the mouse*. En: Proceedings of the Investigative Dermatology Conference Washington, DC, J Invest Dermatol.
- Fausti, S.A., Larson, V.D., Noffsinger, D., Wilson, R.H., Phillips, D.S. y cols. (1994). High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 15, 232-9.
- Feldman, L., Efrati, S., Eviatar, E., Abramsohn, R., Yarovoy, I., Gersch, E. y cols. (2007). Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int* 72, 359-63.
- Fetoni, A.R., Quaranta, N., Marchese, R., Cadoni, G., Paludetti, G., Sergi, B. (2004b). The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. *Int J Audiol* 43, 465-70.

- Fetoni, A.R., Sergi, B., Ferraresi, A., Paludetti, G., Troiani, D. (2004a). Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 124, 421-6.
- Fischel-Ghodsian, N. (1999). Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 28; 99-109.
- Fisher, M.J., Lange, B.J., Needle, M.N. y cols. (2004). Amifostine for children with medulloblastoma treated with cisplatin-based chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 43, 780-4.
- Fouladi, M., Chintagumpala, M., Ashley, D. y cols. (2008). Amifostine protects against cisplatin-induced ototoxicity in children with average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol* 26, 3749-55.
- Gale, C.R., Hall, N.F., Phillips, D.I., Martyn, C.N. (2001). Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology* 108, 1992-8.
- Gallegos-Castorena, S., Martínez-Avalos, A., Mohar-Betancourt, A. y cols. (2007). Toxicity prevention with amifostine in pediatric osteosarcoma patients treated with cisplatin and doxorubicin. *Pediatr Hematol Oncol* 24, 403-8.
- García-Berrocal, J.R., Nevado, J., Ramírez-Camacho, R., Sanz, R. y cols. (2007). The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *British Journal of Pharmacology* 152, 1012-20.
- García-Berrocal, J.R., Nevado, J., González-García, J.A., Sánchez-Rodríguez, C., Sanz, R., Trinidad, A. y cols (2010). Heat shock protein 70 and cellular disturbances in cochlear cisplatin ototoxicity model. *J Laryngol Otol* 124, 599-609.
- García Callejo, F.J., Pla Gil, I., Bécares Martínez, C., Calvo Gómez, J., Montoto Elena, M.J., Marco Algarra, J.M. (2011). Uso de agentes antioxidantes en la prevención de la hipoacusia inducida por cisplatino. Estudio en pacientes con carcinoma nasofaríngeo. *An ORL Mex* 56, 4.
- Gil-Carcedo, L.M. (2007). *Otología*, 22. Valladolid, Editorial Menarini.
- Gilmer Knight, K.R., Kraemer, D.F., Neuwelt, E.A. (2005). Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol* 23, 8588-96.
- Giordano, P., Lorito, G., Ciorba, A., Martini, A., Hatzopoulos, S. (2006). Protection against cisplatin ototoxicity in a Sprague-Dawley rat animal model. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 26, 198-207.

- Goel, R., Cleary, S.M., Horton, C., Kirmani, S., Abramson, I., Kelly, C., Howell, S.B. (1989). Effect of sodium thiosulfate on the pharmacokinetics and toxicity of cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 81, 1552-60.
- González-García, J.A., Nevado, J., García-Berrocal, J.R., Sánchez-Rodríguez, C., Trinidad, A. y cols. (2010). Endogenous protection against oxidative stress caused by cisplatin: role of superoxide dismutase. *Acta Otolaryngol* 130, 453-7.
- Goycoolea, M.V. (2001). Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 121, 437-47.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., Blanco, I. (1998). Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. *Br J Nutr* 80, 445-9.
- Graterol Torres, D. (2011). *Estudio de los factores mitocondriales y ambientales que contribuyen a la sordera por cisplatino*. Trabajo de investigación descriptivo y observacional.
- Greenwood, D.D. (1990). A cochlear frequency-position function for several species V29 years later. *J Acoust Soc Am* 87, 2592-605.
- Guitton, M.J., Caston, J., Ruel, J., Jonson, R.M., Pujol, R., Puel, J.L. (2003). Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci* 23, 3944-52.
- Gunes, D., Kirkim, G., Kolatan, E., Guneru, E.A., Ozogul, C., Altun, Z. y cols. (2011). Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy* 57, 186-94.
- Hagunani, C.A., Kempton, J.B., De Gagne, J.M., Trune, D.R. (2006). Intratympanic injection of dexamethasone: time course of inner ear distribution and conversion to its active form. *Otol Neurotol* 27, 564-69.
- Hamers, F.P., Klis, S.F., Gispen, W.H., Smoorenburg, G.F. (1994). Application of a neuroprotective ACTH (4-9) analog to affect cisplatin ototoxicity: an electrocochleographic study in guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251, 23-9.
- Harris, K.C., Hu, B., Hangauer, D., Henderson, D. (2005). Prevention of noise-induced hearing loss with Src-PTK inhibitors. *Hear Res* 208, 14-25.
- Herr, I., Ucur, E., Herzer, K. y cols. (2003). Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res* 63, 3112-20.
- Hill, G.W., Morest, D.K., Parham, K. (2008). Cisplatin-induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. *Otol Neurotol* 29, 1005-11.

- Himeno, C., Komeda, M., Izumikawa, M., Takemura, K., Yagi, M., Weiping, Y., y cols. (2002). Intra-cochlear administration of dexamethasone attenuates aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res* 67, 61-70.
- Hirose, Y., Simon, J.A., Ou, H.C. (2011). Hair cell toxicity in anti-cancer drugs: evaluating an anti-cancer drug library for independent and synergistic toxic effects on hair cells using the zebrafish lateral line. *J Assoc Res Otolaryngol* 12, 719-28.
- Hitchcock, Y.J., Tward, J.D., Szabo, A., Bentz, B.G., Shrieve, D.C. (2009). Relative contributions of radiation and cisplatin-based chemotherapy to sensorineural hearing loss in head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73, 779-88.
- Holley, M.C., Lawlor, P.M. (1997). Production of conditionally immortalized cell lines from a transgenic mouse. *Audiol Neurotol* 2, 25-35.
- Horvath, G., Szoke, E., Kemeny, A., Bagoly, T., Delit, J. y cols. (2012). Lutein inhibits the function of the transient receptor potential A1 ion channel in different in vitro and in vivo models. *J Mol Neurosci* 46, 1-9.
- Howard, A.N., Williams, N.R., Palmer, C.R., Cambou, J.P., Evans, A.E., Foote, J.W. y cols. (1996). Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease? A comparison between Belfast and Toulouse. *Int J Vitam Nutr Res* 66, 113-8.
- Howell, S.B., Taetle, R. (1980). Effect of sodium thiosulfate on cisdichlorodiammineplatinum (II) toxicity and antitumor activity in L1210 leukemia. *Cancer Treat Rep* 64, 611-6.
- Huang, R.S., Duan, S., Shukla, S.J., Kistner, E.O., Clark, T.A., Chen, T.X., Schweiter, y cols. (2007). Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach. *Am J Hum Genet* 81, 427-37.
- Huang, X., Whitworth, A., Rybak, L.P. (2007). Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Otol Neurotol* 28, 828-33.
- Hughes, A.L., Hussain, N., Pafford, R., Parham, K., 2014. Dexamethasone ototoprotection in a multidose Cisplatin ototoxicity mouse model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 150, 115-20.
- Hussain, A.E., Blakley, B.W., Nicolas, M., Balderston, J. (2003). Assessment of the protective effects of amifostine against cisplatin-induced toxicity. *J Otolaryngol* 32, 294-7.
- Hyppolito, M.A., Oliveira, J.A., Rossato, M. (2006). Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263, 798-803.
- Ikeda, Y., Long, D.M. (1990). Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. *Acta Neurochir Suppl* 51, 74-6.

- Iwai, K., Nakagawa, T., Endo, T., Matsuoka, Y., Kita, T. y cols. (2006). Cochlear protection by local insulin-like growth factor application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 116, 529-33.
- Iwamoto, Y., Kawano, T., Ishizawa, M., Aoki, K., Kuroiwa, T., Baba, T. (1985). Inactivation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in blood and protection of its toxicity by sodium thiosulfate in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol* 15, 228-32.
- Iwasaki, T., Hamano, T., Aizawa, K., Kobayashi, K., Kakishita, E. (1994). A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide. *Acta Haematol* 91, 91-4.
- Jamieson, E.R., Lippard, S.J. (2005). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* 99, 2467-98.
- Jiang, H., Talaska, A.E., Schacht, J., Sha, S.H. (2007). Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiol Aging* 28, 1605-12.
- Johnson, E.J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care* 5, 56-65.
- Juhn, S.K., Hamaguchi, Y., Goycoolea, M. (1998). Review of round window membrane permeability. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 457, 43-8.
- Kalciouglu, M.T., Kizilay, A., Gulec, M., Karatas, E., Iraz, M., Akyol, O., y cols. (2005). The protective effect of erdosteine against ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262, 856-63.
- Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F. (2003). A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurotol* 8, 177-189.
- Kalinec, F., Kalinec, G., Boukhvalova, M., Kachar, B. (1999). Establishment and characterization of conditionally immortalized organ of corti cell lines. *Cell Biol Int* 23, 175-84.
- Kalkanis, J.G., Whistworth, C., Rybak, L.P. (2004). Vitamin E Reduces Cisplatin Ototoxicity. *Laryngoscope* 114, 538-42.
- Kaltenbach, J.A., Church, M.W., Blakley, B.W., MacCaslin, D.L., Burgio, D.L. (1997). Comparison of five agents in protecting the cochlea against the ototoxic effects of cisplatin in the hamster. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117, 493-500.
- Kamimura, T., Whitworth, C.A., Rybak, L.P. (1999). Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. *Hear Res* 131, 117-27.
- Kapusuz, Z., Ozkiris, M., Kala, M., Saydam, L. (2013). Protective role of bilberry extract against cisplatin induced ototoxicity in rats. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 65, 339-44.

- Kasse, C.A., Cruz, L.M.O., Iba, L.C.N., Costa, H.O., Lopes, E.C., Coelbo, F. (2008). The use of *Maytenus ilicifolia* to prevent cisplatin-induced ototoxicity. *Rev Bras Otorrinolaringol* 74, 712-7.
- Katzenstein, H.M., Chang, K.W., Krailo, M. y cols. (2009). Amifostine does not prevent platinum-induced hearing loss associated with the treatment of children with hepatoblastoma: A report of the Intergroup Hepatoblastoma Study P9645 as a part of the Children's Oncology Group. *Cancer* 115, 5828-35.
- Kelly, T.C., Whitworth, C.A., Husain, K., Rybak, L.P. (2003). Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 186, 10-6.
- Khachik, F., Spangler, C.J., Smith, J.C. (1997b). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* 69, 1873-81.
- Kharkheli, E., Kevanishvili, Z., Maglakelidze, T., Davitashvili, O., Schacht, J. (2007). Does vitamin E prevent gentamicin-induced ototoxicity?. *Georgian Med News* 146, 14-7.
- King, E.B., Salt, A.N., Kel, G.E., Eastwood, H.T., O'Leary, S.J. (2013). Gentamicin administration on the stapes footplate causes greater hearing loss and vestibulotoxicity than round window administration in guinea pigs. *Hear Res* 304, 159-66.
- Kizilay, A., Kalcioglu, M.T., Ozerol, E., Iraz, M., Gulec, M., Akyol, O., Ozturan, O. (2004). Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats. *J Chemother* 16, 381-7.
- Knight, K.R., Kraemer, D.F., Winter, C., Neuwelt, E.A. (2007). Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol* 25, 1190-5.
- Kobayashi, H., Ohashi, N., Watanabe, Y. y cols. (1987). Clinical features of cisplatin vestibulotoxicity and hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 49, 67-72.
- Kolls, J., Xie, J., LeBlanc, R. y cols. (1994). Rapid induction of messenger RNA for nitric oxide synthase II in rat neutrophils in vivo by endotoxin and its suppression by prednisolone. *Proc Soc Exp Biol Med* 205, 220-9.
- Korver, K.D., Rybak, L.P., Whitworth, C.A., Campbell, K.C. (2002). Round window application of D-mehitonine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 126, 683-9.
- Kotecha, B., Richardson, G.P. (1994). Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear Res* 73, 173-84.

- Kriegelstein, C.F., Granger, D.N. (2001). Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 14, 44–54.
- Krinsky, N.I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *J Nutr* 132, 540-42.
- Kuduban, O., Kucur, C., Sener, E., Suleyman, H., Akcay, F. (2013). The role of Thiamine Pyrophosphate in prevention of cisplatin ototoxicity in an animal model. *Scientific World Journal* 16.
- Kupka, S., Toth, T., Wrobel, M., Zeissler, U., Szyfter, W., Szyfter, K. y cols. (2002). Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian and Polish patients. *Hum Mutat* 19, 308-9.
- Lagziel, A., Overlack, N., Bernstein, S.L., Morell, R.J., Wolfrum, U., Friedman, T.B. (2009). Expression of cadherin 23 isoforms is not conserved: implications for a mouse model of Usher syndrome type 1D. *Mol Vis* 15, 1843–57.
- Landrum, J.T., Bone, R.A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* 385, 28–40.
- Laurell, G., Jungnelius, U. (1990). High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope* 100, 724-34.
- Lawlor, P., Marcotti, W., Rivolta, M.N., Kros, C.J., Holley, M.C. (1999). Differentiation of mammalian vestibular hair cells from conditionally immortal, postnatal supporting cells. *J Neurosci* 1, 19: 9445-58.
- Lee, J.S., Kang, S.U., Hwang, H.S., Pyun, J.H., Choung, Y.H., Kim, C.H. (2010). Epicatechin protects the auditory organ by attenuating cisplatin-induced ototoxicity through inhibition of ERK. *Toxicol Lett* 15, 199: 308-16.
- Lee, C., Shin, J., Cho, Y. (2011). Protective effect of minocycline against cisplatin-induced ototoxicity. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 4, 77-82.
- Lee, J.H., Marcus, D.C. (2002). Nongenomic effects of corticosteroids on ion transport by stria vascularis. *Audiol Neurotol* 7, 100-6.
- Lee, K.Y., Nakagawa, T., Okano, T., Hori, R., Ono, K., Tabata, Y., Lee, S.H., Ito, J. (2007). Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 28, 976-81.

- Lee, S.H., Kim, H.S., An, Y.S., Chang, J., Choi, J., Im, G.J. (2015). Protective effect of resveratrol against cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 79, 58-62.
- Leite, M.T., Gomes, H.C., Percario, S. y cols. (2007). Dimethyl sulfoxide as a block to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap in the rat. *Plast Reconstr Sur* 120, 1819-22.
- Lemon, R., Dunnett, S.B. (2005). Surveying literatura from animal experiments. *British Medical Journal* 330, 977-8.
- Lefebvre, P.P., Staecker, H. (2002). Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 122, 698-702.
- Li, G., Frenz, D.A., Brahmblatt, S., Feghali, J.G., Ruben, R.J., Berggren, D. y cols. (2001). Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicology* 22, 163-76.
- Li, Y., Womer, R.B., Silber, J.H. (2004). Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 40, 2445-51.
- Light, J.P., Silverstein, H. (2004). Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12, 378-83.
- Liu, X.H., Yu, R.B., Liu, R., Hao, Z.X., Han, C.C., Zhu, Z.H., Ma, L. (2014). Association between lutein and zeaxanthin status and the risk of cataract: a meta-analysis. *Nutrients* 6, 452-65.
- Liu, J.P., Dai, C.F., Wang, Z.M., Chi, F.L., Tian, J., Da, C.D. (2006). Distribution of gentamicin in inner ear after intratympanic gentamicin injection. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 41, 851-56.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Guerrero, J.M., Rojas, F., Delgado, F. (2000). Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 28, 73-80.
- Lorito, G., Hatzopoulos, S., Laurell, G., Campbell, K.C., Petrucci, J., Giordano, P. y cols. (2011). Dose-dependent protection on cisplatin-induced ototoxicity an electrophysiological study on the effect of three antioxidants in the Sprague-Dawley rat animal model. *Med Sci Monit* 17, 179-86.
- Löwenheim, H., Kil, J., Gültig, K., Zenner, H.P. (1999). Determination of hair cell degeneration and hair cell death in neomycin treated cultures of the neonatal rat cochlea. *Hear Res* 128, 16-26.

- Lu, C., Mattson, M.P. (2001). Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Exp Neurol* 170, 180-5.
- Lynch, E.D., Gu, R. Pierce, C., Kil, J. (2005). Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear Res* 201, 81-9.
- Mares-Perlman, J.A., Fisher, A.I., Palta, M., Block, G., Millen, A.E., Wright, J.D. (2001). Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol* 153, 424-32.
- Marina, N., Chang, K.W., Malogolowkin, M., London, W.B., Frazier, A.L., Womer, R.B. y cols. (2005). Amifostine does not protect against the ototoxicity of high-dose cisplatin combined with etoposide and bleomycin in pediatric germ-cell tumors: a Children's Oncology Group study. *Cancer* 104, 841-47.
- Martin, K.R., Wu, D., Meydani, M. (2000). The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 150, 265-74.
- Marshak, T., Steiner, M., Kaminer Levy, L., Shupak, A. (2014). Prevention of cisplatin-induced hearing loss by intratympanic dexamethasone: a randomized controlled study. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 150, 983-90.
- McCammon, K.A., Lentzner, A.N., Moraiarty, R.P., Schellhammer, P.F. (1998). Intravesical dimethyl sulfoxide for primary amyloidosis of the bladder. *Urology* 52, 1136-8.
- McGonigle, P., Ruggeri, B. (2014). Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* 87, 162-71.
- Melki, S.J., Heddon, C.M., Frankel, J.K. y cols. (2010). Pharmacological protection of hearing loss in the mouse model of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 120, 1637-45.
- Meltser, I., Canlon, B. (2011). Protecting the auditory system with glucocorticoids. *Hear Res* 281, 47-55.
- Mikulec, A.A., Plontke, S.K., Hartsock, J.J., Salt, A.N. (2009). Entry of substances into perilymph through the bone of the otic capsule after intratympanic applications in guinea pigs: implications for local drug delivery in humans. *Otol Neurotol* 30, 131-8.
- Min, J.Y., Min, K.B. (2014). Serum lycopene, lutein and zeaxanthin, and the risk of Alzheimer's disease mortality in older adults. *Dement Geriatr Cogn Disord* 37, 246-56.

- Minami, S.B., Sha, S.H., Schacht, J. (2004). Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 198, 137-43.
- Momin, S.R., Melki, S.J., Obokhare, J.O. y cols. (2011). Hearing preservation in Guinea pigs with long-standing endolymphatic hydrops. *Otol Neurotol* 32, 1583-9.
- Morassi, P., Massa, F., Mesesnel, E., Magris, D., Dagnol, B. (1989). Treatment of amyloidosis with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Minerva Med* 80, 65-70.
- More, S.S., Akil, O., Ianculescu, A.G. y cols. (2010). Role of the copper transporter CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J Neurosci* 30, 9500-9.
- Murphy, D., Daniel, S.J. (2011). Intratympanic Dexamethasone to prevent cisplatin ototoxicity: a guinea pig model. *Otolaryngol-Head and Neck Surgery* 145, 452-7.
- Mukherjea, D., Jajoo, S., Kaur, T., Sheehan, K.E., Ramkumar, V., Rybak, L.P. (2010). Intratympanic administration of Short Interfering (si) RNA for the NOX3 isoform of NADPH Oxidase Protects Against Cisplatin-Induced Hearing Loss in Rat. *Antioxid Redox Signal* 13, 589-98.
- Mukherjea, D., Jajoo, S., Whitworth, C. y cols. (2008). Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuated cisplatin-induced hearing loss in the rat. *J Neurosci* 28, 13056-65.
- Muldoon, L.L., Pagel, M.A., Kroll, R.A., Brummett, R.E., Doolittle, N.D., Zuhowski, E.G. y cols. (2000). Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. *Clin Cancer Res* 6, 309-15.
- Muller, M., von Hunerbein, K., Hoidis, S., Smolders, J.W. (2005). A physiological place frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 202, 63.
- Munguia, R., Sahmkow, S.I., Funnell, R.J., Daniel, S.J. (2010). Transtympanic Ringer's lactate application in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in a Chinchilla animal model. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 143, 134-40.
- Murphy, D., Daniel, S.J. (2011). Intratympanic Dexamethasone to prevent cisplatin ototoxicity: a guinea pig model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 145, 452-7.
- Nader, M.E., Théoët, Y., Saliba, I. (2010). The role of intratympanic lactate injection in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. *Laryngoscope* 120, 1208-13.
- Nagura, M., Iwasaki, S., Wu, R. y cols. (1999). Effects of corticosteroid, contrast medium and ATP on focal microcirculatory disorders of the cochlea. *Eur J Pharmacol* 366, 47-53.
- Nakai, Y., Konishi, K., Chang, K.C. y cols. (1982). Ototoxicity of the anticancer drug cisplatin. An experimental study. *Acta Otolaryngol* 93, 227-32.

- Nakagawa, T., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Kikkawa, Y.S., Yamamoto, N., y cols. (2010). Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial. *BMC Med* 25, 8: 76.
- Namdaran, P., Reinhart, K.F., Owens, K.N., Raibel, F.W. (2012). Identification of modulators of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *J Neurosci* 32, 3516-28.
- Neuwelt, E.A., Brummett, R.E., Doolittle, N.D., y cols. (1998). First evidence of otoprotection against carboplatin-induced hearing loss with a two-compartment system in patients with central nervous system malignancy using sodium thiosulfate. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 77-84.
- Niles, R.M. (2002). The use of retinoids in the prevention and treatment of skin cancer. *Expert Opin Pharmacother* 3, 299-303.
- Oh, S.H., Yu, W.S., Song, B.H., Lim, D., Koo, J.W., Chang, S.O., Kim, C.S. (2000). Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplan-induced acute ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 120, 146-50.
- Ohtani, I., Ohtsuki, K., Anzai, T., Ouchi, J., Saito, T. (1985). Reduction of cisplatin ototoxicity by fosfomycin in animal model. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 47, 229-35.
- Oldenburg, J., Kraggerud, S.M., Cvancarova, M., Lothe, R.A., Fossa, S.D. (2007). Cisplatin-Induced Long-Term Hearing Impairment Is Associated With Glutathione-S-Transferase Genotypes in Testicular Cancer Survivors. *J Clin Oncol* 25, 708-14.
- Olgun, Y., Kirkim, G., Kolatan, E., Kiray, M., Bagriyanik, A., Olgun, A., y cols. (2014). Friend or Foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 124, 760-66.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M. (2003). Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-year doubleblind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 19, 21-24.
- Olmedilla-Alonso, B., Beltrán-de-Miguel, B., Estévez-Santiago, R., Cuadrado, C. (2014). Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations and macular pigment density. *Nutrition J* 13, 52.
- Olmedilla, B., Orarado, F., Gil-Martinez, E., Blanco, I. (1997). Supplementation with lutein (4 months) and alpha-tocopherol (2 months), in separate or combined oral doses, in control men. *Cancer Lett* 114, 179-81.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A.J., Blanco, I., Gil-Martinez, E., y cols. (2002). A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with alpha-tocopherol,

- carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: analysis of serum responses. *Clin Sci (Lond)* 102, 447-56.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-65.
- Otto, W.C., Brown, R.D., Gage-White, L., Kupetz, S., Anniko, M., Penny, J.E., Henley, C.M. (1988). Effects of cisplatin and thiosulfate upon auditory brainstem responses of guinea pigs. *Hear Res* 35, 79-85.
- Ou, H.C., Santos, F., Raible, D.W., Simon, J.A., Rubel, E.W. (2010). Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs deal prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today* 15, 265-71.
- Ou, H., Simon, J.A., Rubel, E.W., Raible, D.W. (2012). Screening for chemicals that affect hair cell death and survival in the zebrafish lateral line. *Hear Res* 288, 58-66.
- Ou., H.C., Cunningham, L.L., Francis, S.P., Brandon, C.S., Simon, J.A., Raible, D.W., Rubel, E.W. (2009). Identification of FDA-approved drugs and bioactives that protect hair cells in the zebrafish (*Danio rerio*) lateral line and mouse (*mus musculus*) utricle. *J Assoc Res Otolaryngol* 10, 191-203.
- Ou, H.C., Santos, F., Raible, D.W., Simon, J.A., Rubel, E.W. (2010). Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs deal prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today* 15, 265-71.
- Ou, H., Simon, J.A., Rubel, E.W., Raible, D.W. (2012). Screening for chemicals that affect hair cell death and survival in the zebrafish lateral line. *Hear Res* 288, 58-66.
- Owens, K.N., Santos, F., Roberts, B., Linbo, T., Coffin, A.B., Knisely, A.J., y cols. (2008). Identification of genetic and chemical modulators of zebrafish mechanosensory hai cell death. *PLos Generade* 29, 4.
- Ozkiris, M., Kapusuz, Z., Karaçavuş, S., Saydam, L. (2013). The effects of lycopene on ciplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270, 3027-33.
- Ozturk, M., Ucar, S., Sari, F., Erdogan, S., Topdag, M., Iser, M. (2013). Possible protective effect of sertraline against cisplatin-induced ototoxicity: An experimental study. *Scientific WorldJournal* 1, 523480.
- Paksoy, M., Ayduran, E., Sanh, A., Eken, M., Aydun, S., Oktay, Z.A. (2011). The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. *Med Oncol* 28, 615-21.

- Parham, K. (2011). Can intratympanic Dexamethasone protect against cisplatin ototoxicity in mice with age-related hearing loss?. *Otolaryngol Head Neck Surg* 145, 635-40.
- Parnes, L.S., Sun, A.H., Freeman, D.J. (1999). Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 109, 1-17.
- Pommier, R.F., Woltering, E.A., Milo, G., Fletcher, W.S. (1988). Synergistic cytotoxicity between dimethyl sulfoxide and antineoplastic agents against ovarian cancer in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 159, 848-52.
- Plontke, S., Lowenheim, H., Preyer, S. y cols. (2005). Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* 125, 830-9.
- Prim, M.P., De Diego, I., De Sarriá, M.J., Gavilán, J. (2001). Alteraciones vestibulares y del sistema oculomotor en sujetos tratados con cisplatino. *Acta Otolaringol Esp* 52, 367-70.
- Qi, W., Ding, D., Salvi, R.J. (2008). Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hear Res* 236, 52-60.
- Ramirez-Camacho, R., Citores, M.J., Trinidad, A., Verdaguer, J.M., García-Berrocal, J.R. y cols. (2007). HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 127, 564-7.
- Ramírez-Camacho, R., Fernández, D.E., Verdaguer, J.M., Gómez, M.M., Trinidad, A., y cols. (2008). Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration. *Acta Otolaryngol* 128, 505-9.
- Ramirez-Camacho, R., García-Berrocal, J.R., Trinidad, A., Martín Marero, A., Buján, J. (2002). Cochlear cytotoxic activity of cisplatin in experimentation animals. A study using scanning electron microscopy. *Acta Otorrinolaringol Esp* 53, 538-42.
- Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P. (1995). Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 76, 386-94.
- Reser, D., Rho, M., Dewan, D., Herbst, L., Li, G., Stupak, H., Zur, K., Romaine, J., y cols. (1999). L- and D- methionine provide equivalent long term protection against CDDP-induced ototoxicity in vivo, with partial in vitro and in vivo retention of antineoplastic activity. *Neurotoxicology* 20, 731-48.
- Ress, B.D., Sridhar, K.S., Balkany, T.J., Waxman, G.M., Stagner, B.B., y cols. (1999). Effects of cisplatin chemotherapy on otoacoustic emissions: The development of an objective screening protocol. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 693-701.

- Repine, J.E., Pfenninger, O.W., Talmage, D.W., Berger, E.M., Pettijohn, D.E. (1981). Dimethyl sulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci* 78, 1001-3.
- Reynaud, D., Demin, P.M., Sutherland, M., Nigam, S., Pace-Asciak, C.R. (1999). Hepoxilin signaling in intact human neutrophils: biphasic elevation of intracellular calcium by unesterified hepoxilin A3. *FEBS Lett* 446, 236-8.
- Richardson, G.P., Russel, I.J. (1991). Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity. *Hear Res* 53, 293-311.
- Riga, M.G., Chelis, L., Kakolyris, S., Papadopoulos, S., Stathakidou, S., y cols. (2013). Transtympanic injections of N-acetylcysteine for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity: a feasible method with promising efficacy. *Am J Clin Oncol* 36, 1-6.
- Rivolta, M.N. Grix, N., Lawlor, P., Ashmore, J.F., Jagger, D.J., Holley, M.C, (1998). Auditory hair cell precursors immortalizes from the mammalian inner ear. *Proc Biol Sci* 7, 265: 1595-603.
- Roldán-Fidalgo, A., Trinidad, A., Rodríguez-Valiente, A., García-Berrocal, J.R., Millán, I., y cols. (2014). Effect of intratympanic Dimethyl sulfoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur Arch Otolaryngol* 271, 3121-6.
- Roy, S., Ryals, M.M., Van den Bruele, A.B., Fitzgerald, T.S., Cunningham, L.L. (2013). Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. *J Clin Invest* 123, 4945-9.
- Rozenzweig, M., Von Hoff, D.D., Slavik, M., Muggia, F.M. (1977). Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med* 86, 803-12.
- Rybak, L.P., Mukherjea, D., Jajoo, S., Ramkumar, V. (2009). Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 219, 177-86.
- Rybak, L.P. (2007). Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg* 15, 364-9.
- Rybak, L.P., Husain, K., Evenson, L., Morria, C., Whitworth, C., Somani, S.M. (1997). Protection by 4-methylthiobenzoic acid against cisplatin-induced ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 81, 173-9.
- Rybak, L.P., Husain, K., Morris, C., Whitworth, C., Somari, S. (2000). Effect of Protective Agents Against Cisplatin Ototoxicity. *Am J Otol* 21, 513-20.
- Rybak, L.P., Whitworth, C., Somani, S. (1999a). Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 109, 1740-4.

- Rybak, L.P., Husain, K., Whitworth, C., Somani, S.M. (1999b). Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 47, 195-202.
- Rybak, L.P., Ravi, R., Somani, S.M. (1995). Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Fundam Appl Toxicol* 26, 293-300.
- Sagit, M., Korkmaz, F., Akcadag, A. (2013). Protective effect of thymoquinone against cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270, 2231-7.
- Saito, T., Aran, J.M. (1994). Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 56, 315-20.
- Saito, T., Zhang, Z.J., Manabe, Y., Ohtsubo, T., Saito, H. (1997). The effect of sodium thiosulfate on ototoxicity and pharmacokinetics after cisplatin treatment in guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254, 281-6.
- Saldanha, C., Santos, N.C., Martins-Silva, J. (2002). Fluorescent probes DPH, TMA-DPH and C17-HC induce erythrocyte exovesiculation. *J Membr Biol* 190, 75-82.
- Salehi, P., Akinpelu, O.V., Waissbluth, S., Peleva, E., Meehan, B., Rak, J., Daniel, S.J. (2014). Attenuation of cisplatin ototoxicity by otoprotective effects of nanoencapsulated curcumin and dexamethasone in a guinea pig model. *Otol Neurotol* 35, 131-9.
- Saliba, I., El Fata, F. (2012). Is intratympanic injection of erdosteina protective against cisplatin-induced ototoxicity?. *Neurotox Res* 21, 302-8.
- Saliba, I., El Fata, F., Ouelette, V., Robitaille, Y. (2010). Are intratympanic injections of N-Acetylcysteine and Methylprednisolone protective against cisplatin-induced ototoxicity?. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 39, 236-43.
- Salim, A.S. (1992a). Allopurinol and dimethyl sulfoxide improve treatment outcomes in smokers with peptic ulcer disease. *J Lab Clin Med* 119, 702-9.
- Salim, A.S. (1992b). Oxygen-derived free-radical scavengers prolong survival in gastric cancer. *Chemotherapy* 38, 135-44.
- Salchi, P., Akinpelu, O.V., Waissbluth, S., Peleva, E., Meehan, B., Rak, J., Daniel, S.J. (2014). Attenuation of cisplatin ototoxicity by otoprotective effects of nanoencapsulated Curcumin and Dexamethasone in a Guinea Pig model. *Otol Neurotol* 35, 1131-9.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Saldanha, C., Martins-Silva, J. (2002). Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethyl-sulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium* 31, 183-8.

- Salim, A.S. (1992a). Allopurinol and dimethyl sulfoxide improve treatment outcomes in smokers with peptic ulcer disease. *J Lab Clin Med* 119, 702-9.
- Salim, A.S. (1992b). Oxygen-derived free-radical scavengers prolong survival in gastric cancer. *Chemotherapy* 38, 135-44.
- Salt, A.N., Plontke, S. (2005). Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* 10, 1299-306.
- Sarduy, M., del Castillo, I., Villamar, M., Romero, L., Herraiz, C., y cols. (1998). *Genetic study of mitochondrially inherited sensorineural hearing impairment in eight large families from Spain and Cuba*. Capítulo 22, páginas 121-5. En: "Developments in Genetic Hearing Impairment", Stephens D, Read A, Martini A (eds.). Londres, Whurr Publishers.
- Sastry, J., Kellie, S.J. (2005). Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol* 22, 441-5.
- Schacht, J., Talaska, A.E., Rybak, L.P. (2012). Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anatomical Record* 295, 1837-50.
- Schoenfeld, R.H., Belville, W.D., Jacob, W.H., Buck, A.S., Dresner, M.L., Insalaco, S.J., Ward, G.S. (1983). The effect of dimethyl sulfoxide on the uptake of cisplatin from the urinary bladder of the dog: a pilot study. *J Am Osteopath Assoc* 82, 570-73.
- Serpeloni, J.M., Cólus, I.M., de Oliveira, F.S., Aissa, A.F., Mercadante, A.Z., y cols. (2014). Diet carotenoid lutein modulates the expression of genes related to oxygen transporters and decreases DNA damage and oxidative stress in mice. *Food Chem Toxicol* 70, 205-13.
- Sha, S.H., Iu, J.H., Schacht, J. (2006). Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N Engl J Med* 27, 354: 1856-7.
- Shafik, A.G., Elkabarity, R.H., Thabet, M.T., Soliman, N.B., Kalleny, N.K. (2013). Effect of intratympanic dexamethasone administration on cisplatin-induced ototoxicity in adult guinea pigs. *Auris Nasus Larynx* 40, 51-60.
- Shin, Y.S., Song, S.J., Kang, S.U., Hwang, H.S., Choi, J.W., Lee, B.H. y cols. (2012). A novel synthetic compound, 3-amino-3-(4-fluoro-phenyl)-1h-quinoline-2,4-dione, inhibits cisplatin-induced hearing loss by the suppression of reactive oxygen species: in vitro and in vivo study. *Neuroscience* 1, 232: 1-12.
- Simşek, G., Tokgoz, S.A., Vuralkan, E., Caliskan, M., Besalti, O., Akin, I. (2013). Protective effects of resveratrol on cisplatin-dependent inner-ear damage in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270, 1789-93.

- Sundelin, S.P., Nilsson, S.E. (2001). Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31, 217-25.
- Sommerburg, O., Keunen, J.E., Bird, A.C., Van Kuijk, F.J. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br J Ophthalmol* 82, 907-10.
- So, H., Kim, H., Lee, J.H., Park, C., Kim, Y., y cols. (2007). Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol* 8, 338-55.
- Stengs, C.H., Klis, S.F., Huizing, E.H., Smoorenburg, G.F. (1998). Protective effects of a neurotrophic ACTH (4-9) analog on cisplatin ototoxicity in relation to the cisplatin dose: an electrocochleographic study in albino guinea pigs. *Hear Res* 124, 108-17.
- Suarez, C. y cols. (2007). *Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. 2nd Ed. Madrid, Ed. Médica Panamericana.
- Sundelin, S.P., Nilsson, S.E. (2001). Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31, 217-25.
- Sundquist, W.I., Ahmed, K.J., Hollis, L.S., Lippard, S.J. (1987). Solvolysis reactions of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) in dimethyl sulfoxide, structural characterization and DNA binding of trans-[Pt(NH₃)₂(Me₂SO)Cl]⁺. *Inorg Chem* 26, 1524-8.
- Szonyi, M., He, D.Z., Ribari, O., Sziklai, I., Dallos, P. (1999). Cyclic GMP and outer hair cell electromotility. *Hear Res* 137, 29-42.
- Szonyi, M., He, D.Z., Ribaru, O., Sziklai, I., Dallos, P. (2001). Intracellular calcium and outer hair cell electromotility. *Brain Res* 922, 65-70.
- Takemura, K., Komeda, M., Yagi, M. y cols. (2004). Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 196, 58-68.
- Teranishi, M., Nakashima, T. (2003). Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67, 133-9.
- Teranishi, M., Nakashima, T., Wakabayashi, T. (2001). Effects of α -tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res* 151, 61-70.
- Tian, C.J., Kim, Y.J., Kim, S.W., Lim, H.J., Kim, Y.S., Choung, Y.H. (2013). A combination of cilostazol and Ginkgo biloba extract protects against cisplatin-induced cochlear-vestibular dysfunction by inhibiting the mitochondrial apoptotic and ERK pathways. *Cell Death Dis* 21, 4.

- Tokgöz, S.A., Vuralkan, E., Sonbay, N.D., Caiskan, M., Saka, C., Bealti, Ö., Akin, I. (2012). Protective effect of vitamins E,B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Laryngol Otol* 126, 464-9.
- Tombran-Tink, J., Barnstable, C.J. (2007). Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics, and Therapeutics. *Humana Press* 2, 139.
- Topdag, M., Iseri, M., Gelenli, E., Yardimoglu, M., Yazir, Y. y cols. (2012). Effect of intratympanic dexamethasone, memantine and piracetam on celular apoptosis due to cisplatin ototoxicity. *J Laryngol Otol* 126, 1091-6.
- Ünal, M., Güven, M., Devranoğlu, K., Özeydin, A. y cols. (2007). Glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open angle glaucoma: a study in a Turkish population. *Br J Ophthalmol* 91, 527-30.
- Uribe, P.M., Mueller, M.A., Gleichman, J.S., Kramer, M.D., Wang, Q., Sibrian-Vazquez, M. y cols. (2013). Dimethyl sulfoxide (DMSO) exacerbates cisplatin-induced sensory hair cell death in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* 8.
- Van As, J.W., Van Den Berg, H., Van Dalen, E.C. (2012). Medical interventions for the prevention of platinum-induced hearing loss in children with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 16, 5.
- Viberg, A., Canlon, B. (2004). The guide to plotting to cochleogram. *Hear Res* 197, 1-10.
- Vijayapadma, V., Ramyaa, P., Pavithra, D., Krishnasamy, R. (2014). Protective effect of lutein against benzo(a) pyrene-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Toxicol Ind Health* 30, 284-93.
- Waissbluth, S., Dupuis, I., Daniel, S.J. (2012). Protective effect of erdosteina against cisplatin-induced ototoxicity in a guinea pig model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 146, 627-32.
- Wang, D., Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer durgs. *Nat Rev Drug Discov* 4, 307-20.
- Wang, J., Lloyd Faulconbridge, R.V., Fetoni, A., Guitton, M.J., Pujol, R., Puel, J.L. (2003). Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology* 45, 380-93.
- Wang, M., Zhang, C., Lin, X. (2008). Protective effect of lutein against blue light-induced retinal damage in rat. *Wei Sheng Yan Jiu* 37, 409-12.
- Watanabe, K.I., Hess, A., Bloch, W., Michel, O. (2000). Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 11, 401-6.

- Webster, D., Berlin, C., Skolnick, P. (1996). N-methyl-D-aspartate antagonist limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. *Nat Med* 2, 1338-43.
- Whitworth, C.A., Ramkumar, V., Jones, B., Tsukasaki, N., Rybak, L.P. (2004). Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* 67, 1801-7.
- Wimmer, C., Mees, K., Stumpf, P., Welsch, U., Reichel, O., Suckfüll, M. (2004). Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. *Otol Neurotol* 25, 33-40.
- Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., Sternberg, P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5, 32.
- Wolters, F.L., De Vocht, T.F., Klis, S.F., Hamers, F.P., Smoorenburg, G.F. (2002). Co-treatment with melanotan-II, a potent melanocortin, does not protect against cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 172, 110-7.
- Wright, C.G., Schaefer, S.D. (1982). Inner ear histopathology in patients treated with cisplatin. *Laryngoscope* 92, 1408-13.
- Wrona, M., Rozanowska, M., Czub-Pelech, B., Sarna, T. (2001). Antioxidant action of zeaxanthin in protection of human RPE cells against oxidative damage. *Assoc Res Vision Ophthalmol* 42, 576.
- Wysocki, J. (2005). Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hear Res* 199, 103-10.
- Xiong, M., He, Q., Wang, J., Lai, H. (2011). Astragalosides reduce cisplatin ototoxicity in guinea pigs. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 73, 131-6.
- Xu, O., Liu, Y., Li, X., Yang, Y., Zhang, Z., Wang, N. y cols. (2011). Protective effects of Salvia miltiorrhiza against cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Am J Otolaryngol* 32, 228-34.
- Xu, X., Lin, X. (2010). Molecular mechanism of the protective effect of lutein against retinal damage induced by blue-light in rats. *Wei Sheng Yan Jiu* 39, 689-92.
- Yassuda, C., Righetti, A., Cury, M., Hyppolito, M., De Oliveira, J.A., Feres, O. (2008). The role of hyperbaric oxygen therapy (hot) as an otoprotection agent against cisplatin ototoxicity. *Acta Cir Bras* 23, 72-6.
- Yazici, Z.M., Meric, A., Midi, A., Arinc, Y.V., Kahya, V., Hafiz, G. (2012). Reduction of cisplatin ototoxicity in rats by oral administration of promegranate extract. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269, 45-52.

- Yin, H.Y., Ma, X.F., Liu, F., Xia, M., Xu, A.T. (2009). Protective effect of geranylacetone on cisplatin ototoxicity. *Chemotherapy* 55, 1-5.
- Yoo, J., Hamilton, S.J., Angel, D., Fung, K., Frnaklin, J., Parnes, L.S., y cols. (2014). Cisplatin otoprotection usinf trasntympanic L-N-acetylcysteine: a pilot randomized study in head and neck cancer patients. *Laryngoscope* 124, 87-94.
- Yumusakhuylu, A.C., Yazici, M., Sari, M., Binnetoglu, A., Kosemihal, E., y cols. (2012). Protective role of reseveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76, 404-8.
- Zallocchi, J., Delimont, D., Meehan, D.T., Cosgrove, D. (2012). Regulated vesicular trafficking of specific PCDH15 and VLGR1 variants in auditory hair cells. *J Neurosci* 32, 13841-59.
- Zhang, X.Q., Eyzaguirre, C. (1999). Effects of hypoxia induced by Na₂S₂O₄ on intracellular calcium and restiong potential of mouse glomus cells. *Brain Res* 818, 118-26.
- Zuur, C.L., Simis, Y.J., Lansdaal, P.E. y cols. (2007). Ototoxicity in a randomized phase III trial of intra-arterial compared with intravenous cisplatin chemoradiation in patients with locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 25, 3759-65.

8. ANEXOS

ANEXO I

Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E., García-Berrocal, J.R., 2012. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 269, 2455-2459.

ANEXO 2

Roldán-Fidalgo A, Trinidad A, Rodríguez-Valiente A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. , Protective agents against cisplatin induced ototoxicity in mamilian models: An overview of literature : Journal of Head & Neck physicians and surgeons Vol 3 ,Issue 2, 2014.

ANEXO 3

Roldán-Fidalgo, A., Trinidad, A., Rodríguez-Valiente, A.,García-Berrocal, J.R., Millán, I., Coronado, M.J., Ramírez-Camacho, R., 2014. Effect of intratympanic Dimethyl sulfoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. Eur Arch Otolaryngol 271: 3121-6.

IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF LUTEIN AGAINST CISPLATIN-INDUCED OTOTOXICITY

Roldán-Fidalgo A, Martín Saldaña S*, Trinidad A, Olmedilla-Alonso B**, Rodríguez Valiente A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Department of Otorhinolaryngology, Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Universidad Autónoma de Madrid. *Foundation for Biomedical Research, Puerta de Hierro Hospital. **Institute of Food Science, Technology and Nutrition, CSIC, Madrid, Spain.

Corresponding author:

Amaya Roldán Fidalgo

C/ Manuel de Falla, 1

28222 Majadahonda.

Madrid. Spain.

Telephone: +34 619 12 27 29

+ 34 91 191 72 20

Fax: + 34 91 373 05 35

e-mail: amayarf@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Cisplatin is a commonly prescribed drug that produces ototoxicity as a secondary side effect. Lutein is a carotenoid with antioxidant and anti-inflammatory properties previously tested for eye, heart and skin diseases and currently commercialized as a dietary supplement, but not evaluated to date in ear diseases.

Aim: To evaluate the protective effects of lutein on HEI-OC1 auditory cell line and in a Wistar rat models of cisplatin ototoxicity.

Materials and Methods: *In vitro study:* Culture HEI-OC1 cells were exposed to lutein (2.5 to 100 μ M) and to 25 μ M cisplatin for 24 hours. *In vivo study:* Twenty eight female Wistar rats were randomized into three groups. Group A (n=8) received intratympanic lutein (0.03ml) (1mg/ml) in the right ear and saline solution in the left one to determine the toxicity of lutein. Group B (n=8) received intratympanic lutein (0.03ml) (1mg/ml) in the right ear and intraperitoneal cisplatin (10mg/kg) to test the efficacy of lutein against cisplatin ototoxicity. Group C (n=12) received intratympanic lutein in the right ear (0.03ml) (1mg/ml) to quantify lutein in cochlear fluids (30 minutes, 1h and 5 days after treatment). Hearing function was evaluated by means of Auditory Steady-State Responses before and 5 days after the procedure (groups A and B). Morphological changes were studied by confocal laser scanning microscopy.

Results: *In vitro study:* Lutein reduced significantly the CDDP-induced cytotoxicity in the HEI-OC1 cells when cells were pre-treated with concentrations of 60 and 80 μ M. *In vivo study:* Intratympanic lutein (1mg/ml) application did not show any ototoxic effects and no protection against cisplatin-induced ototoxicity was detected in Wistar rats.

Conclusions: Although lutein has shown beneficial effects in other pathologies, the present study only obtained protection against cisplatin ototoxicity in culture cells, but not in the *in vivo* model. The big size of the molecule, the low amount of drug administered, and restriction to diffusion inside the inner ear could account for this negative result. Further research is needed to determine the suitability of systemic *vs* intratympanic lutein for the prevention of cisplatin ototoxicity.

Keywords: cisplatin; lutein; ototoxicity; carotenoids

INTRODUCTION

Cisplatin is a commonly prescribed platinum-based drug used to treat different types of solid tumors (testicular and ovarian carcinoma, squamous head and neck carcinoma, advanced bladder cancer, lung carcinoma, malignant gliomas and metastatic cancers such as melanoma, mesothelioma, prostate and breast cancer). Severe side effects such as ototoxicity, nephrotoxicity, myelotoxicity and gastrointestinal toxicity have been reported due to cisplatin treatment. Although nephrotoxicity can be diminished or controlled with hydration therapy, ototoxicity still poses a limitation to effective cisplatin chemotherapy (McKeage, 1995).

There is a great interest in developing effective strategies to protect the inner ear without compromising the antitumoral activity of cisplatin. Unfortunately, no therapy is currently approved for clinical use. Many experimental studies have attempted to evaluate different substances against reactive oxygen species (ROS) overload and other cell signaling systems at an early stage to stop the apoptotic pathways. There is a clear rationale behind the testing of antioxidants against cisplatin ototoxicity as the overload of ROS after cisplatin administration has been shown to be one of the main mechanisms triggering death pathways inside auditory sensory cells (Casares, et al., 2012).

Lutein is a chemical compound belonging to the group of xanthophylls. It is the second carotenoid most frequently found in human serum (Khachik, et al., 1997) and it is present in foods such as corn, papaya, dairy, cereal, citrus fruits and green leafy vegetables such as spinach and kale (Sommeburg, et al., 1998). The molecular structure of lutein has two hydroxyl groups, one at each end of the molecule, which is essential for its biological action as antioxidant (Johnson, 2002; Winkler, et al., 1999). There have been many studies regarding the benefits of lutein in humans due to its antioxidant properties. Most of them deal with the potential protective action of lutein mainly on eye diseases (Landrum, et al., 2001; Beatty, et al., 1999; Duncan, et al., 2002) and also in heart (Howard, et al., 1996; Krieglstein, et al., 2001; Martin, et al., 2000) and skin diseases (Alves Rodrigues, et al., 2004; Britton, 1995; Krinsky, 2002; Dreher, et al., 2001). Recently, its protective effect against neurodegenerative disorders such as Alzheimer and Parkinson diseases was suggested (Min, et al., 2014; Nataraj, et al., 2015). The routes of lutein administration used were the oral and the topical routes. Most of the articles published in the scientific literature demonstrate that administration of lutein in the diet or as a dietary supplement is safe and effective.

Up to the date there are no reports evaluating the effect of lutein on the inner ear. Due to the common characteristics between the inner ear and retina, its antioxidant effect and the involvement of ROS overload in the cisplatin ototoxic effects, we hypothesized that lutein might play a role as a protective agent against cisplatin ototoxic effects.

The aim of the present study was to evaluate the potential protector effect of lutein against cisplatin-initiated damage to the cochlea in both *in vitro* and *in vivo* experiments.

MATERIALS AND METHODS

In vitro study

1. Chemicals

Cisplatin (1 mg/ml) was purchased from Accord Healthcare (Barcelona, Spain).

Lutein (Xanthophyll from Marigold) was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich; St.Louis, USA). Lutein is a very lipophilic carotenoid, so it was diluted in 0.5% DMSO in phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, Germany) and different dilutions were prepared from stock solution.

2. Cell culture

The House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) cell line was kindly provided by Dr. Federico Kalinec (House Ear Institute, Los Angeles, CA). The establishment and characterization of the conditionally immortalized HEI-OC1 cell line were previously described (Kalinec, et al., 2003).

HEI-OC1 cells were maintained in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, BRL), 5% L-Glutamine (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and Penicillin-G (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at 33°C in a humidified incubator with 10% CO₂.

For the experiments described below, HEI-OC1 cells were cultured under permissive conditions: 33 °C, 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS

3. Cell viability Assay

AlamarBlue® (Invitrogen) is a proven cell viability indicator that uses the natural reducing power of living cells to convert resazurin to the fluorescent molecule, resorufin. The active ingredient, resazurin, is a nontoxic, cell permeable compound that is blue in color and virtually nonfluorescent. Upon entering cells, resazurin is reduced to resorufin, which produces very bright red fluorescence. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, thereby generating a quantitative measure of viability—and cytotoxicity. Absorbances at 570 nm were measured on a Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT (BioTek Instruments; Vermont,

USA). The treatments were done in replicates (eight wells for treatment in a microplate). Results of the experiments are expressed as percentage of viable cells (% of viable cells).

4. Hoechst 33258 staining

Hoechst 33258 staining apoptotic cell death was determined by evaluating the nuclear morphology using Hoechst 33258 staining. Cells were incubated with 10 mg/mL of the Hoechst 33258 (Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 20 min. Membrane-permeable Hoechst 33258 was a blue fluorescent dye and stained the cell nucleus. After washing twice with phosphate buffered saline (PBS), the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT). After two washings with distilled water, the cells were evaluated under fluorescence microscope Nikon Eclipse TE 2000-S with a DS-U2 camera controller (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands).

5. Lutein toxicity assay

HEI-OC1 cells were seeded in 96-well plates, with each well containing 3×10^4 cells. After a 24-h incubation under permissive conditions (33°C, 10% CO₂ in DMEM), the cells were treated with different lutein dilutions (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 or 100 µM) and viability assessed after 24 hours.

6. Cisplatin toxicity assay

Cells were treated with different cisplatin dilutions (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 or 60 µM) and viability assessed after 24 hours. Concentration of 25 µM was the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for 24 hours in DMEM.

7. Lutein effects against cisplatin toxicity

HEI-OC1 cells were seeded as explained above. Cisplatin was added 3 hours after lutein administration to allow carotenoid's endocytosis by cells. Cells were exposed to 25 µM cisplatin (IC₅₀).

8. Statistical analysis

All experiments were performed 8 times in duplicate. The analysis of variance was used to assess the differences in the means across treatment groups involving cell-culture experiments with multiple treatments. One-way ANOVA was used to analyze for statistical significance of the results. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant. Tukey test was used to identify significant differences between the paired treatments. Data processing

and analysis were performed using the Origin Pro 8 software (Origin Lab Corporation, Northampton, USA).

In vivo study

The study was carried out in accordance with the guidelines for research involving animals (Spanish Animal Care and Use Committee, Spanish Law 32/ 2007 and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), and was approved by the Animal Welfare Ethics Committee of the Foundation for Biomedical Research of the Puerta de Hierro Hospital (CEBA 013/2012).

Animals

Female Wistar rats weighing 250-275g were used. Animals were bred and handled at the animal facilities of our centre in temperature controlled rooms, with light-dark cycles, and with free access to food and water. Before each procedure, an otoscopy was performed to all animals to exclude outer and middle ear infections, using an operating microscope. Rats showing signs of current or past middle ear infection were excluded from this study.

Experimental groups

Twenty eight animals were randomly assigned into three groups:

Group A (n=8) received intratympanic lutein (0.03ml) (1mg/ml) in the right ear (0.03ml) and saline solution in the left ear (0.03ml), to determine the toxicity of lutein.

Group B (n=8) received intratympanic lutein (0.03ml) in the right ear, saline solution (0.03ml) in the left ear and intraperitoneal cisplatin (10mg/kg), to test the efficacy of lutein against cisplatin ototoxicity.

Group C (n=12) received intratympanic lutein (0.03ml) (1mg/ml) in the right ear. Animals were euthanized and cochlear fluid sampled 30 minutes (n = 4), 1 hour (n = 4) and 5 days (n = 4) after lutein administration, to measure the diffusion of lutein from middle into inner ear.

Study design

Animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/Kg) and diazepam (0.1 mg/Kg). Pretreatment Auditory Steady-State Responses (ASSR) was obtained from the animals in groups A and B. Following the ASSR measurements, lutein and saline solution were injected intratympanically using a spinal needle (BD Whitecare 27G). After lutein injection the anesthetized animals remained in lateral decubitus for 30 minutes in order to maximize the time

of contact between the solution and the round window membrane and to prevent its leakage into the pharynx through the Eustachian tube. This procedure was equally performed in both groups.

After intratympanic injection, animals from group B received treatment with cisplatin through a slow intraperitoneal infusion along 30 minutes. Animals were housed in individual cages with *ad libitum* water and food. Five days after treatment a new ASSR evaluation was performed. The threshold auditory levels were compared with the pretreatment values. Animals were euthanized by decapitation after CO suffocation.

Temporal bones were obtained for histological study in groups A and B and for perilymphatic fluid sampling in group C.

Lutein preparation

Lutein was diluted in 0.5% DMSO with PBS. DMSO was chosen as the solvent because of its ability to increase the round window membrane permeability. Moreover, a previous study from our group showed that intratympanic 0.5% DMSO was not intrinsically ototoxic and did not increase the ototoxic effect of cisplatin (Roldán-Fidalgo, et al., 2014).

Auditory Steady-State Responses

Subcutaneous electrodes were placed over the vertex (active) and in the pinna of each ear (reference). An insert earphone (Etymotic ER-2) was placed directly into the external auditory canal. Ground electrodes were placed over the neck muscles. ASSR were recorded using an evoked potential averaging system (Intelligent Hearing System Smart-EP, FL, USA) in an electrically shielded, double-walled, sound-treated booth in response to 100ms clicks or tone burst, at 8, 12, 16, 20, 24 and 32kHz with 10ms plateau and 1ms rise/fall time. Intensity was expressed in decibels sound pressure level (dB SPL) peak equivalent. Intensity series were recorded, and an ASSR threshold was defined by the lowest intensity able to induce a replicable visual detectable response.

Histology

Cochlear portion of the temporal bone was isolated. Stapes was removed and round window membrane carefully incised, in order to perfuse glutaraldehyde through the round window to rinse the endolymphatic and perilymphatic spaces. The whole piece was fixed in glutaraldehyde for 24 hours and decalcified in 1% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at room temperature with daily changes for 10-12 days. Cochleae were dissected in PBS medium and cochlear surface extracts were laid for confocal microscopy analysis (Leica TCS SP5 with a 63x objective). The total number of outer hair cells (OHC) and the OHC loss (considered by the

presence of empty spaces in OHC rows) were reported for each extract. Cell counts were performed at the time of imaging by sequentially viewing the image slices.

Lutein quantification

In group C, after the removal of the temporal bone and isolation of the cochlear portion, the bony apex of the cochlea was removed with a needle. The tip of a 50 micro liter Hamilton pipette was adjusted to the cochlear apical opening and the perilymphatic fluid suctioned with the help of a syringe pump. The presence of lutein in the sampled fluid was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

The HPLC is a complex system composed of a model 6000 pump, a rheodyne injector, a photodiode detector (Waters, Milford, MA, USA, model 2998), a Spheri-5-ODS column (220mm x 4.6mm) (Brownlee Labs, Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA) and a guard column (ODS Aquapore type RP-18) (Olmedilla-Alonso, et al., 2014). The chromatogram has a 1.8ml/min flow and detection at 450nm, and has been processed using the Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

The perilymph processing for the lutein detection was conducted trying to concentrate as much as possible the obtained sample:

1. Centrifugation of the sample to concentrate the liquid at the bottom of the Eppendorf (1 minute). 300µl of water, 30µl of ethanol (EtOH) and 60µl of hexane was added to facilitate it.
2. Vortex was performed during 1 minute.
3. Centrifugation of the sample during 5 minutes at 3500 rpm. The supernatant was collected and dried under nitrogen and reconstituted with 25µl of EtOH and tetrahydrofuran (THF) (2:1). The mixture was then stirred under ultrasound.
4. Injection of the entire volume into the HPLC.

The concentration of lutein in the curve normally used to make serum determinations was 0.27-1.36mg mL⁻¹ (R² = 0.999). All the samples were stored at -80°C until analysis.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using the SPSS statistical software package (SPSS, version 16.0 for windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Comparison among the groups with ASSR thresholds were evaluated using one-way and two-way analysis of variance (ANOVA). Paired samples T-test were used to compare the ASSR thresholds before and after

lutein administration in groups A and B. Values of $p > 0.05$ were considered as statistically significant.

RESULTS

In vitro study

Toxicity assays

Cell cultures treated with lutein alone showed no significant cell damage or cell loss (Fig. 1A). A clear dose effect was observed. Low carotenoid concentration did not affect cell viability, but exposure to concentrations over than 80 μM produced a significant reduction on cell viability.

The HEI-OC1 cell line treated with cisplatin showed statistically significant cell damage (Fig. 1B). Changes of the pro-apoptotic nuclei were observed after Hoechst 33258 staining. Higher doses of cisplatin decreased survival of the cells in a dose-dependent manner. After the exposure of the cells to cisplatin, the cellular viability was reduced from 10 μM to higher concentrations. Concentrations from 20 μM to 100 μM were cytotoxic since they decrease cell viability over 70%. Because of that, 25 μM of cisplatin concentration was chosen as a proper dose to test the protective effect of lutein against antitumoral toxicity.

Lutein effect against cisplatin ototoxicity

Cytoprotective effect was observed in HEI-OC1 cells exposed to cisplatin after pretreatment with lutein. Statistically significant increase in cell viability was seen after pretreatment with lutein at concentrations 60 and 80 μM (Figure 2A). Cell viability as a percentage of control was 84% and 81% at 80 and 60 μM , respectively ($p < 0.05$). Lower concentrations of lutein were not able to prevent cell death. Cytotoxic concentration of lutein (100 μM) did not show any protection against cisplatin.

Apoptosis of HEI-OC1 cells induced by cisplatin was also evaluated by nuclear Hoechst 33258 staining after 24 hours treatment (Fig.2 B, C and D). Cells treated with cisplatin alone showed decreased survival and exhibited apoptotic nuclei (Fig.2B). When cells received 80 μM lutein (Fig.2C), cell viability was preserved when compared to control group (C-) (Fig.2D).

In vivo study

Group A

Post-treatment ASSR recordings were found to be lower than pre-treatment ASSR recordings, both in the study ear (lutein) and the control ear (saline solution), but the differences were not statistically significant for any of the tested frequencies (Fig. 3). These findings suggest that lutein is not intrinsically ototoxic for the inner ear when it is applied intratympanically.

Confocal microscope showed a preservation of outer (OHC) and inner hair cells (IHC) in all specimens (Fig. 4) with integrity of cilia (Fig. 5).

Group B

Differences between pre- and post-treatment thresholds in the group B were less marked in the right ear (lutein) compared to the left ear (saline solution) (Fig. 6), but there were no statistically significant differences between both ears ($p>0.05$).

Severe structural changes and scarce OHC were observed, with no damage to the IHC. The percentage of missed OHC was similar both in the study ear (lutein) and the control ear (saline solution). Cells undergoing apoptosis showed morphological changes such as chromatin condensation and nuclear pyknosis or fragmentation. No statistically significant differences in hair cell damage were found between both ears ($p>0.05$).

Lutein quantification

Lutein was detected in only one sample from a rat euthanized 30 minutes after lutein intratympanic administration. The method employed in the present study was not able to determine the exact amount of lutein present in the cochlear fluid due to the extremely low amount of the substance detected.

DISCUSSION

In this study, we evaluated dose-dependent effect of lutein on HEI-OC1 cell line challenged with cisplatin and report that lutein demonstrates a dose-dependent cytoprotective effect *in vitro*. A protective effect was found in an *in vivo* animal model of cisplatin ototoxicity (albino Wistar rat) although this protection did not reach statistical significance.

Although a great diversity of pharmacological strategies have been investigated to protect cochlear structures against cisplatin effects without interference with its antitumoral activity, no therapy is currently approved to prevent cisplatin ototoxicity.

In view of the role of reactive oxygen species as a main apoptosis-inducing mechanism after cisplatin administration, antioxidants have been proposed as good candidates to protect inner ear against cisplatin treatment. In a recent overview of the literature to evaluate the efficacy of molecules tested in animal cisplatin ototoxicity models (Roldán-Fidalgo, et al., 2015), 40 out of 64 candidates were antioxidants and the antioxidant substances achieved functional otoprotection in a higher percentage of studies than non-antioxidant agents. A systematic review of literature would be necessary to further analyze these findings in depth, but it is remarkable how often antioxidant molecules have been tested as potential otoprotectors.

Lutein is a carotenoid possessing antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties (Vijayapadma, et al., 2014). In the field of ophthalmological diseases, it is well known that lutein and zeaxanthin are present in the macula and lens of the human eye (Landrum, et al., 2001; Olmedilla-Alonso, et al., 2014). These carotenoids have a dual ocular function, contributing on the filtration of ultraviolet rays and exerting an antioxidant function against ROS produced by this radiation. Observational studies have shown an inverse relationship between the intake of lutein and the presence of macular degeneration related to age (Mares-Perlman, et al., 2001), cataracts (Olmedilla-Alonso, et al., 2003; Gale, et al., 2014; Liu, et al., 2014) and retinitis pigmentosa (Beatty, et al., 2000). Lutein antioxidant activity has been biochemically reported from *in vitro* studies using human erythrocytes [Vijayapadma, et al., 2014] and human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). Studies on the effects of lutein in oxidative stress parameters in lab animals and cell cultures have shown that lutein might act scavenging reactive species and also inducing the expression of genes related to a better antioxidant response (Serpeloni, et al., 2014; Aimjongjun, et al., 2013).

There are several similarities between the inner ear and the retina. Photoreceptor and retinal pigment epithelial (RPE) cells and hair cells of the inner ear have a very similar structure. All cells present regions of amplified plasma membrane (the apical microvilli in RPE cells, the disk membranes in photoreceptor cells and the stereocilia in hair cells) (Tombran-Tink, et al., 2007). There is a polarized organization within the plane of an epithelium cell of both organs. Planar polarity is essential for nervous system development and function, mutations in planar polarity genes result in several defects as blindness, hearing loss or vestibular disorders. Most of the variants in the two organs have the same molecular weights, which portends to similar functional roles for these proteins in the cochlea and the retina. Recent biochemical analysis documents a number of protein variants for VLGR1, cadherin 23, and protocadherin 15 in the cochlea and the retina (Lagziel, et al., 2009; Zallocchi, et al., 2012). Diseases that affect both eye and ear such as Usher syndrome or Susac syndrome involve common anatomical structures.

Because of the involvement of ROS generation and inflammation mediators in cisplatin toxicity (Casares, et al., 2012), there is a strong rationale for testing lutein as a protective agent against cisplatin-induced damage due to its antioxidant and anti-inflammatory effects.

Many methods for otoprotection described in experimental studies employ systemic administration routes. However, there are concerns in the scientific community about the possibility that systemic administration of a protective molecule could interfere with the antitumoral effect of cisplatin. These concerns have limited the clinical use of protective agents (Blackley, et al., 2001). In fact, some authors have proposed to delay administration of otoprotector in *in vivo* models and such delay has been proved to provide hearing protection while preserving antitumoral effects of cisplatin (Dickey, et al., 2005). Nevertheless, local intratympanic route is a simple and safe method currently employed in the treatment of patients suffering from sudden sensorineural hearing loss and immunomediated hearing loss and we thus consider the intratympanic injection an adequate administration route for testing protectors in animal ototoxicity studies.

Intratympanic administration of an agent-containing solution allows the agent diffusion across the round window membrane into the inner ear, where it can exert its effects. This route has been shown to provide higher levels of corticosteroids within the inner ear compared to systemic routes (Parnes, et al., 1999).

Protective effects of lutein in the *in vivo* study were present, although did not reach statistical significance. This could be due to several reasons: a) Total amount of solution available within the middle ear limited by the volume capacity of the middle ear in the rat, which is of 0.05 μ L; b) Loss of the agent through the Eustachian tube or by diffusion to the cochlear aqueduct; c) Insufficient dilution of lutein in DMSO; d) Limitations to the pass of lutein through the round window membrane due to adherences; and e) Impaired diffusion of lutein due to its high molecular weight (although big molecules can trespass the round window membrane by pinocytosis (Juhn, et al., 1989).

DMSO employed to dissolve lutein is a diffusion facilitating agent, but the fact that lutein was detected only in 1 of the perilymph samples suggests that transport of the molecule to the perilymphatic spaces could be impaired by some of the above mentioned factors. Other possible causes for lack of detection of lutein in the samples are: a) Diffusion of lutein could be limited to the first minutes after injection; c) high liposolubility of lutein that impairs diffusion once the substance is in the perilymphatic space.

Potential for improvement could be found by enhancing the solubility of lutein, by using other diffusion facilitators and by increasing lutein stability and diffusion through nanotechnology. A more detailed knowledge of the cisplatin molecular processes could clarify

whether certain antioxidants could be more effective in modulating specific pathways. Testing systemic routes of administration for lutein warrant further research as several studies have shown that chemoprotection route and timing of administration can be manipulated to maintain CDDP antitumor efficacy while protecting against chemotherapy toxic side effects (Neuwelt, et al., 2006; Dickey, et al., 2005).

CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, the present paper is the first study to perform an evaluation of the effect of intratympanic lutein administration *in vitro* and *in vivo*. Although lutein achieved otoprotection in HEI-OC1 cells challenged with cisplatin, the present study could not show any protective effect against cisplatin toxicity in an *in vivo* model Wistar rat with the dose and the administration route employed.

Acknowledgements:

Research supported by a Spanish FIS Grant EI 11/00742.

The authors wish to thank Dr. Federico Kalinec (House Ear Institute, Los Angeles, CA) for the HEI-OC1 cell line facilitation, Alejandro Kurtz for assisting with the English language, and Isabel Millan for helping with the Statistical analysis.

REFERENCES

- Aimjongjun S, Sutteerawattananonda M, Limpeanchob N. Silk lutein extract and its combination with vitamin E reduce UVB-mediated oxidative damage to retinal pigment epithelial cells. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Jul 5;124:34-41]
- Alves Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett*. 2004; 15; 150: 57-83.
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Kob HH, Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83: 867-877.
- Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000; 45: 115-134.
- Blakley BW, Cohen JI, Doolittle ND, Muldoon LL, Campbell KC, Dickey DT, and Neuwelt EA (2002) Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy: review and summary of the annual meeting of the Blood-Brain Barrier Disruption Program, Gleneden Beach, Oregon, March 10, 2001. *Laryngoscope* 112:1997–2001.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995; 9: 1551-1558.
- Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*. 2012; 269:2455-2459.
- Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Sep;314(3):1052-8.
- Duncan IL, Aleman TS, Gardner LM; De Castro E, Marks D, Emmons IM, et al. Macular pigment supplementation in choroideremia. *Exp Eye Res*. 2002; 74: 371-381.
- Dreher F, Maibach H. Protective effects of topical antioxidants in humans. *Curr Probl Dermatol*. 2001; 29: 157-164.
- Gale CR, Hall NF, Phillips DI, Martyn CN. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology*. 2014; 108: 1992-1998.
- Howard AN, Williams NR, Palmer CR, Cambou JP, Evans AE, Foote JW, Marques-Vidal P, McCrum EE, Ruidavets JB, et al. Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease? A comparison between Belfast and Toulouse. *Int J Vitam Nutr Res*. 1996; 66: 113-118.

- Johnson EJ. The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care*. 2002; 5: 56-65.
- Juhn SK, Hamaguchi Y, Goycoolea M. Review of round window membrane permeability. *Acta Otolaryngol Suppl* 1989;457:43-48.
- Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F., 2003. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol. Neurotol.* 8, 177–189.
- Khachik F, Spangler CJ, Smith JC. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem*. 1997; 15: 69: 1873-1881.
- Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001; 14, 44-54.
- Krinsky NI. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *J Nutr*. 2002; 132: 540-542.
- Lagziel A, Overlack N, Bernstein SL, Morell RJ, Wolfrum U, Friedman TB. Expression of cadherin 23 isoforms is not conserved: implications for a mouse model of Usher syndrome type 1D. *Mol Vis*. 2009; 15: 1843–1857.
- Landrum JT, Bone RA. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 1: 385: 28-40.
- Liu XH, Yu RB, Liu R, Hao ZX, Han CC, Zhu ZH, Ma L. Association between lutein and zeaxanthin status and the risk of cataract: a meta-analysis. *Nutrients*. 2014; 22: 6: 452-465.
- Mares-Perlman JA, Fisher AI, Palta M, Block G, Millen AE, Wright JD. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol*. 2001; 1; 153: 424-432.
- Martin KR, Wu D, Meydani M. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2000; 150: 265-274.
- Min JY, Min KB. Serum lycopene, lutein and zeaxanthin, and the risk of Alzheimer's disease mortality in older adults. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014; 37: 246-256.
- McKeage MJ. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug. Saf.* 1995; 13:228–244.

Nataraj J, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM. Lutein protects dopaminergic neurons against MPTP-induced apoptotic death and motor dysfunction by ameliorating mitochondrial disruption and oxidative stress. *Nutr Neurosci*. 2015; 2:NNS398.

Neuwelt EA, Gilmer-Knight K, Lacy C, Nicholson HS, Kraemer DF, Doolittle ND, Hornig GW, Muldoon LL. Toxicity profile of delayed high dose sodium thiosulfate in children treated with carboplatin in conjunction with blood-brain-barrier disruption. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Aug;47(2):174-82.

Olmedilla-Alonso B, Miguel Beltran B, Estévez-Santiago R, Cuadrado C. Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake serum concentrations and macular pigment density. *Nutr J*. 2014; 3; 13: 52.

Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-year doubleblind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*. 2003; 19: 21-24.

Parnes LS, Sun AH, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope*. 1999;109:1-17.

Roldán-Fidalgo A, Trinidad A, Rodríguez-Valiente A, García-Berrocal JR, Millán I, Coronado MJ, Ramírez-Camacho R. Effect of intratympanic Dimethyl sulfoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014; 271: 3121-3126.

Roldán-Fidalgo A, Trinidad A, Rodríguez-Valiente A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R., 2015. Protective agents against cisplatin induced ototoxicity in mammalian models: An overview of literature : *Journal of Head & Neck physicians and surgeons* 3, 2.

Serpeloni JM, Cólus IM, de Oliveira FS, Aissa AF, Mercadante AZ, Bianchi ML, Antunes LM. Diet carotenoid lutein modulates the expression of genes related to oxygen transporters and decreases DNA damage and oxidative stress in mice. *Food Chem Toxicol* 2014 Aug;70:205-13

Sommerburg O, Keunen JE, Bird AC, Van Kuijk FJ. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82: 907-910.

Tombran-Tink J, Barnstable CJ. *Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics, and Therapeutics*, Humana Press. 2007; 2; 139.

Vijayapadma V, Ramyaa P, Pavithra D, Krishnasamy R. Protective effect of lutein against benzo(a)pyrene-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Toxicol Ind Health*. 2014 Apr;30(3):284-93

Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999; 3; 5: 32.

Zallocchi J, Delimont D, Meehan DT, Cosgrove D. Regulated vesicular trafficking of specific PCDH15 and VLGR1 variants in auditory hair cells. *J Neurosci.* 2012; 32: 13841–13859.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of lutein and cisplatin (CDDP) on HEI-OC1 cells over 24 hours. Cell viability was measured by AlamarBlue® assay. (A) HEI-OC1 cells were treated with different lutein concentration. (B) HEI-OC1 cells were treated with various concentrations of CDDP for 24 hours. The data represent the means, the standard deviation and the ANOVA results of eight independent experiments performed in duplicate ($p < 0.05$ versus control (C-) treated determined using an independent Tukey test).

Figure 2. Effect of treatment with lutein and 25µM cisplatin (CDDP) after 3 hours of carotenoid administration on HEI-OC1 cells over 24 hours. Cell viability was measured by AlamarBlue® assay. (A) HEI-OC1 cells were treated with various concentrations of lutein against 25µM cisplatin. Fluorescent micrograph of HEI-OC1 cells in 2D culture with Hoechst 33258 staining after treatment. (B) HEI-OC1 were treated only with 25µM cisplatin as a control of toxicity, (C) with 80 µM lutein and 25µM cisplatin and (D) only treated with 0.5% DMSO in PBS as a viability control. The data represent the means, the standard deviation and the ANOVA results of eight independent experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$ versus control (C-) and only cisplatin groups treated determined using an independent Tukey test).

Figure 3: Hearing thresholds before and after lutein treatment (right ear), and saline solution (SS) (left ear).

Figure 4. Right ear. Histological sections of the middle turn of the cochlea treated with intratympanic lutein. It could be seen the amplification of the outer and inner hair cells.

Figure 5. Right ear. Histological section of the apical turn of cochlea treated with lutein. It could be observed the ciliary structure as a "V" of the outer hair cells.

Figure 6. Hearing thresholds before and after lutein plus cisplatin (CDDP) (right ear), and saline solution (SS) plus cisplatin (left ear).